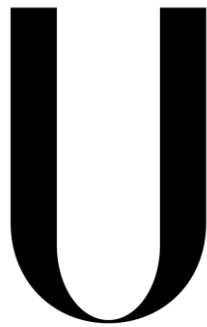


Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE
ESTUDOS CLÍNICOS SOBRE FATORES DE
TRANSFERÊNCIA**

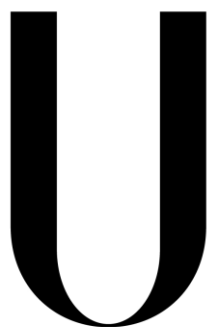
Maria Sofia Soares Fonseca

Mestrado em Cuidados Farmacêuticos

2016

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE ESTUDOS CLÍNICOS SOBRE FATORES DE TRANSFERÊNCIA

Maria Sofia Soares Fonseca

Mestrado em Cuidados Farmacêuticos

Dissertação de Mestrado orientada pelo Prof. Doutor Bruno Sepodes e Co-orientada pelo Prof. Doutor Rui Manuel Amaro Pinto

2016

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, pela oportunidade que me concedeu de terminar o Mestrado em Cuidados Farmacêuticos e por toda a formação que me ministrou para o levar a efeito.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Bruno Miguel Nogueira Sepodes e ao meu co-orientador, Prof. Doutor Rui Manuel Amaro Pinto pela orientação e acompanhamento ao longo destes anos.

À minha amiga Maria Emília Ruas, médica pediatra, que entusiasticamente me abordou pela primeira vez o tema dos Fatores de Transferência, falando-me das suas aplicações em várias patologias e do desconhecimento e resistência da maioria dos seus colegas relativamente a esta nova abordagem terapêutica. No mês seguinte ao seu falecimento, decidi abordar este tema, para que haja seguimento deste trabalho tão louvável.

À minha amiga Maria Manuela Mendes, que desde o início me apoiou a nível motivacional e me acompanhou em horas muito complicadas questionando-me em temas muito importantes para saber exactamente a Meta a que queria chegar.

À minha querida mãe que já não está fisicamente presente mas que continua a acompanhar-me todos os dias, dando-me a força para continuar esta caminhada. Quando ela esteve hospitalizada durante um mês e uma semana, devido a uma broncopneumonia e infecções urinárias resistentes à antibioterapia, senti a determinação para prosseguir este estudo, pela sua importância nesta área.

Ao meu querido pai que me tem acompanhado muitas horas ao lado do computador, motivando-me para chegar à meta.

A todos os médicos, enfermeiros e doentes que participaram no estudo, sem os quais era completamente impossível a realização deste estudo. Também agradeço aos médicos que apesar de quererem participar no estudo, por vários motivos alheios à sua vontade, não o conseguiram realizar.

À Directora da Farmácia Perdigão, Dra Maria José Perdigão, pela disponibilidade constante para cedência de tempo para realizar este trabalho.

À minha colega Sara Ferreira pela constante motivação ao longo desta etapa. E a todos os meus colegas pela sua disponibilidade constante.

Ao Alexei Bravo, pela colaboração com algumas embalagens, para o desenvolvimento dos primeiros Casos Clínicos desenvolvidos em Braga e ao Emanuel Vicente, pela colaboração com mais algumas embalagens e com o envio das mesmas para os médicos e enfermeiros.

Ao Presidente da Associação Portuguesa de Desenvolvimento Rural, Engenheiro Alfredo Marques, pela colaboração económica para o desenvolvimento dos Casos Clínicos realizados em Lisboa e Angola.

E a todos os meus amigos e a cada um que me apoiaram ao longo desta trajectória, com o seu carinho e ajudando-me a concretizar este Grande Sonho.

O meu sincero Muito Obrigado a todos.

RESUMO

Introdução: Os Fatores de Transferência são pequenas moléculas mensageiras imunológicas produzidas pelos organismos de nível superior. A sua função é transferir sinais de reconhecimento imunológico entre células imunológicas, ajudando assim a educar as células imunológicas ingénuas quanto a um perigo presente ou potencial. Atualmente os FT encontram evidência científica em várias patologias: autoimunes, infecto-contagiosas, virais, oncológicas e neurológicas. Existem muitos estudos clínicos publicados e não há até agora conhecimento de bases de dados destes estudos. É bastante importante organizar todo o conhecimento para que seja mais fácil o acesso aos cientistas, ao pessoal de saúde e ao público em geral.

Objetivos: Este estudo pretende divulgar a imunoterapia, com enfoque nos fatores de transferência, através da construção de uma base de dados de estudos clínicos. Além disso foi caracterizado o perfil do doente antes e depois da intervenção clínica, foram referidos os FT usados no estudo e as medidas utilizadas para a avaliação dos quadros clínicos.

Metodologia: Foi implementada uma Base de Dados genérica que suporta a informação e permite atingir os objetivos definidos. Este estudo teve como população alvo pessoas portadoras de patologias do foro imunitário, de todas as idades e âmbitos: na área de Dermatologia, Alergologia, Infeciologia e Drepanocitose residentes em Portugal Continental e Angola (Huambo). Os Casos Clínicos foram recrutados em Clínicas pelos Técnicos de Saúde que aceitaram participar no estudo. Para realizarem o seguimento do Caso Clínico foi fornecido aos Técnicos material de apoio: Caso Clínico Modelo, Questionário, Consentimento Informado e o Protocolo de Avaliação de Casos Clínicos. A dimensão da amostra foi de trinta e um Casos Clínicos e foram angariados entre Maio de 2015 e 2016. Finalmente, após a recolha da informação, foi realizada a introdução e validação dos Casos Clínicos na Base de Dados. A validação foi efectuada por Técnicos de Saúde.

Resultados e Discussão: O estudo incluiu 31 Casos Clínicos com patologias do foro imunitário. A maioria das patologias- (80.6%) registaram melhorias no seu Quadro Clínico durante o tempo de estudo (1 a 3 meses). As patologias que não registaram melhorias, eram doenças auto- imunes que provavelmente denotariam melhorias se fossem seguidas durante um tempo de estudo mais prolongado. Nitidamente, chegámos à conclusão de que os FT são relevantes na

melhoria ou prevenção de patologias como Dermatite, Infecções, Sinusite, Rinite, Asma e Drepanocitose em qualquer idade e sexo, tanto como adjuvantes da terapêutica como isoladamente dependendo da patologia e do seu grau. A Base de Dados onde se inseriram os resultados permitiu suportar e sistematizar o conhecimento.

Conclusão: A Base de Dados provou estar adequada e suficientemente válida, apesar do número de Casos Clínicos ser menor do que o objetivo inicialmente previsto. Através deste estudo demonstrou-se a importância dos FT no Sistema Imunitário e consequentemente, na prevenção, e também o seu papel como adjuvantes da terapêutica, no caso de patologias em que o sistema imunitário precise de ser melhorado.

Palavra-chave: Fatores de Transferência, Imunoterapia, Imunomoduladores, Base de Dados

ABSTRACT

Introduction: Transfer factors are small immune messenger molecules produced by higher-level organisms. Its function is to transfer signals from immune recognition between immune cells, thus helping to educate naïve immune cells about a present or potential danger. Currently there is scientific evidence for the implications of transfer factors in various autoimmune, viral infections, oncological and neurological diseases. There are many published clinical studies, but so far no known databases concerning these studies. It seems very important to organize all this knowledge so that its access to scientists, healthcare professionals and to the general public becomes easier.

Objectives: This study aims to disclose immunotherapy focusing on transfer factors, by building a clinical trials database. Besides, the patient's profile has been characterized before and after clinical interventions, transfer factors used in the study and the measures used for evaluation of clinical status have been reported.

Methodology: a generic database that supports information and allows achieving the objectives has been implemented. This study's population target were people with pathologies of immune disorders, of all ages and levels: in the area of dermatology, allergies, infections and sickle-cell anemia residing in Portugal and Angola (Huambo). The Clinical Cases were recruited from clinics by health technicians who agreed to participate in the study. To carry out the follow-up clinical case, it was provided support material to the Technical: Clinical Case Model Questionnaire, Informed Consent and Clinical Case Assessment Protocol. The sample size was thirty-one clinical cases and they were raised between May 2015 and 2016. Finally, after the assortment of information, the introduction and validation of clinical cases in the database was performed. Health technicians performed the validation.

Results and Discussion: The study included 31 clinical cases with pathologies of immune disorders. Most pathologies - (80.6%) - recorded improvements in their symptoms during the study time (1 to 3 months). The pathologies in which improvements were not recorded have been autoimmune diseases which probably would indicate improvements if they had been followed over a longer study period. Clearly, we reached the conclusion that the transfer factors are relevant in improving or preventing conditions such as dermatitis, infections, sinusitis, rhinitis, asthma and Sickle-cell anemia at any age and sex, both as therapy aids and alone, depending on the pathology and its degree. The database where the results were inserted allowed supporting and systematizing the facts.

Conclusion: The database has proven to be adequate and sufficiently valid, although the number of clinical cases is lower than the originally anticipated goal. Through this study we verified the importance of transfer factors in the immune system and consequently in the prevention as well as its role as a therapeutic adjunct in the case of disorders in which the immune system needs to be improved.

Keywords: Transfer factors, Immunotherapy, immunomodulators, Database

“Não é simplesmente por nós mesmos que crescemos. Devemos uma parte do nosso desenvolvimento à nossa pátria, outra aos nossos pais e outra aos amigos”.

CÍCERO

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	3
RESUMO	5
ABSTRACT.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
1.INTRODUÇÃO	13
1.1. DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS.....	13
1.2. CONCEITOS ATUAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNITÁRIA	14
1.2.1. CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO	14
1.2.1.1. LINFÓCITOS	14
1.2.1.2. FAGÓCITOS.....	15
1.2.1.3. GRANULÓCITOS.....	15
2. FATORES DE TRANSFERÊNCIA	15
2.1. HISTÓRIA.....	15
2.2. DEFINIÇÃO	17
2.3. ORIGEM.....	19
2.4. FONTES	19
2.5. SEGURANÇA	20
2.6. OBTENÇÃO DE FATORES DE TRANSFERÊNCIA	20
2.7. MECANISMOS DE AÇÃO	23
2.8. EDUCADORES DO SISTEMA IMUNITÁRIO - 3R's.....	25
2.9.USO DE FT EM DIFERENTES PATOLOGIAS.....	26
2.6.1. DOENÇAS DERIVADAS DE UMA EXACERBAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO	27
2.6.1.1. ALERGIAS	27
2.6.1.2. DERMATITES ATÓPICAS	28
2.6.1.3. ASMA	32
2.6.2. DOENÇAS AUTOIMUNES	35
2.6.2.1. LÚPUS.....	35
2.6.2.2. ARTRITE REUMATOIDE	36
2.6.2.3. ESCLEROSE MÚLTIPLA	37
2.6.2.4. PSORÍASE.....	39
2.6.3. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS.....	41
2.6.3.1. FIBROMIALGIA	41

2.6.3.2. DOENÇA DE CROHN	42
2.6.3.2.1. TERAPÊUTICA BIOLÓGICA	45
2.6.3.2.2. NOVAS TERAPÊUTICAS	46
2.6.4. DOENÇAS DERIVADAS DE UM DÉFICE DO SISTEMA IMUNITÁRIO	46
2.6.4.1. INFEÇÃO	46
2.6.4.2. CANCRO.....	47
2.6.4.3. TUBERCULOSE.....	51
2.6.4.4. VIH.....	52
2.6.4.5. HEPATITES B e C	54
2.6.4.6. HERPES E OUTRAS DOENÇAS VIRAIS	56
2.6.4.7. DREPANOCITOSE OU ANEMIA FALCIFORME	57
2.7. USOS FUTUROS DOS FATORES DE TRANSFERÊNCIA	60
3.OBJETIVOS	62
3.1.PRINCIPAL.....	62
3.2.ESPECÍFICOS	62
4.METODOLOGIA	63
5. CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE ESTUDOS CLÍNICOS	65
5.1. INVESTIGAÇÃO DE BASE DE DADOS EXISTENTES E RESPECTIVA SELEÇÃO	65
5.2. DEFINIÇÃO E DESCRIÇÃO DOS ITENS DA BASE DE DADOS	66
5.3.CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA BASE DE DADOS	69
5.4.PROMOÇÃO E DIVULGAÇÃO DA MESMA.....	78
BIBLIOGRAFIA.....	81
GLOSSÁRIO.....	90
ANEXOS	95
ANEXO 1 – 4LIFE TRANSFER FACTOR TRI- FACTOR FULL PRESCRIBING INFORMATION- PDR.NET	96
ANEXO 2- CASO CLÍNICO MODELO	103
ANEXO 3- FOLHETO INFORMATIVO, CONSENTIMENTO INFORMADO E QUESTIONÁRIO MÉDICO	104
ANEXO 4- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE CASOS CLÍNICOS.....	108
ANEXO 5- PATENTES	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 – Passos de ativação do linfócito T (LT) pelos FT. TCR é o recetor de linfócito T ..	18
Fig. 2– Produtos disponíveis contendo FT adaptação	23
Fig. 3 –Síntese dos FT	24
Fig. 4 – Sequência de eventos durante uma infeção viral e a resposta imunitária	25
Fig. 5 - Aumento de NK por Produtos Naturais	26
Fig. 6 – Esquema sumário da fisiopatologia da dermatite atópica	29
Fig. 7 – Tabela com as características de asma extrínseca e intrínseca	33
Fig. 8 - Resultados de IgE com e sem FT	34
Fig.9 - Resultados de números de crises com e sem FT.....	35
Fig. 10 – Exemplo de especialidades e técnicos associados.	69
Fig. 11 – Exemplo de técnicos e observações feitas.	70
Fig. 12 – Exemplo de observações por data e especialidade.	71
Fig. 13 – Exemplo de observações em doentes que mostraram melhoria dos sintomas...	72
Fig. 14 – Exemplo de historiais.	73
Fig. 15 – Exemplo de exames pedidos e respetivos resultados.....	74
Fig. 16 – Exemplo de resultados mensais.	75
Fig. 17 – Exemplo de doentes tratados com FT.	76
Fig. 18 – Exemplo de doentes, distribuídos por sexo.	77

1.INTRODUÇÃO

1.1. DISFUNÇÕES IMUNOLÓGICAS, CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

Existem dez sistemas no nosso organismo. Cada sistema tem a sua missão, mas todos estão interligados. O sistema imunitário consiste em mais de um trilião de células, todas juntas com um peso de cerca de 1 Kg, e tem uma vida média de cerca de três meses. Este sistema tem a função de proteger o nosso organismo de bactérias, vírus, parasitas, fungos e células cancerígenas. Isto implica que o sistema imunitário esteja sempre alerta durante as vinte e quatro horas do dia. Basicamente, a função mais importante deste sistema é a proteção contra doenças infecciosas. Os microrganismos podem-nos trazer uma grande variedade de infeções desde as mais comuns até outras mais raras e mais preocupantes (1).

Como os microrganismos se podem apresentar de variadíssimas formas também é necessário haver uma variedade de respostas do sistema imunitário para cada tipo de infeção. O local de infeção e o tipo de agente patogénico determinam quais as respostas imunológicas que poderão ser eficientes. Todos os vírus, algumas bactérias e alguns protozoários replicam no interior das células do hospedeiro e para combater esta infeção o sistema deve reconhecer e destruir as células infetadas. Muitas bactérias e parasitas vivem em tecidos, fluidos corporais e outros espaços extracelulares e as respostas a estes agentes patogénicos são bastante diferentes. Durante o decurso da infeção os agentes patogénicos intracelulares podem atingir outras células através do sangue e doutros fluidos celulares (2).

Qualquer resposta do sistema imunitário reconhece o agente patogénico ou outro agente estranho e secundariamente forja uma reação contra o mesmo para o eliminar. Temos respostas de dois tipos: inata e adaptativa. A diferença essencial entre as duas é que uma resposta adaptativa é altamente específica para um agente patogénico (2).

O sistema imunitário pode falhar por diferentes vias:

- I. Autoimunidade: normalmente o sistema imune reconhece todos os antígenos estranhos e reage contra eles. Se o nosso sistema reage

contra os próprios componentes as doenças autoimunes podem ocorrer. Exemplos de doenças autoimunes são a Artrite Reumatoide.

- II. **Imunodeficiência:** se alguns elementos do sistema imune são deficientes, o indivíduo pode não ter capacidade de lutar contra as infeções. Algumas imunodeficiências são hereditárias e começam após a nascença, outras são adquiridas, como a SIDA.
- III. **Hipersensibilidade:** algumas vezes as reações do sistema imunitário são de hiperatividade. Por exemplo os grãos de pólen são reconhecidos como antigénios por alguns indivíduos, gerando os sintomas de febre ou asma (2).

1.2. CONCEITOS ATUAIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DOS MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNITÁRIA

Existem dez sistemas no nosso organismo. Cada sistema tem a sua missão mas todos estão interligados.

Dentro do sistema imunitário há dois tipos de resposta às substâncias anormais. A primeira resposta é a reação imunológica humoral a qual envolve a formação de imunoglobulinas que também se designam por anticorpos. A segunda resposta é a reação imunológica celular ou imunidade mediada por células (IMC). Esta resposta depende da comunicação entre vários tipos de células do sistema imunitário (linfócitos) (3).

1.2.1. CÉLULAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

1.2.1.1. LINFÓCITOS

Os leucócitos têm origem na medula óssea e desempenham funções especializadas. Um dos tipos de leucócitos são os linfócitos, que se subdividem em 3 tipos:

- I. **linfócitos B** - formam-se na medula óssea e ao encontrar um antigénio geram anticorpos que pertencem à classe das imunoglobulinas e que se designam por Ig.);

- II. linfócitos T - formam-se no Timo e existem três tipos: CD8+ ou células T citotóxicas, CD4+ ou linfócitos T auxiliares e células T supressoras. As células CD8+ atacam os vírus e as bactérias que entram para o interior das células e escapam aos anticorpos. Desta forma a única forma de os eliminar é destruir as células hospedeiras.
- III. Células *Natural Killer*(NK) - são células similares às células T citotóxicas na sua ação. Quando verificam que existem ameaças eliminam-nas o mais rapidamente possível.

1.2.1.2. FAGÓCITOS

Os fagócitos representam uma segunda categoria de leucócitos envolvidos na proteção do corpo contra as infeções. Um tipo de fagócito, o macrófago, tem um papel importante na resposta rápida a um agente patogénico. Os macrófagos situam-se em áreas onde os microrganismos podem entrar, como por exemplo, no trato digestivo, pulmões e a mucosa das membranas.

1.2.1.3. GRANULÓCITOS

O sistema imunitário possui diferentes tipos de células que se chamam granulócitos. Estes contêm grânulos que podem destruir os microrganismos. Um dos tipos de granulócitos são os mastócitos que têm um papel importante nas alergias sazonais.

2. FATORES DE TRANSFERÊNCIA

2.1. HISTÓRIA

A transferência de informação de dadores imunes para recetores não imunes foi descoberta em primeiro lugar, contrariamente a noções populares, por Chase (1945). Neste trabalho leucócitos inteiros de cobaios sensibilizados foram transferidos para cobaios não sensibilizados, induzindo nos segundos uma resposta de hipersensibilidade de tipo retardado (DTH) (4). Contudo, foi uma experiência realizada pelo investigador imunologista americano Dr H. Sherwood Lawrence, que baseada no trabalho de Chase, marcou o início de uma nova etapa na área da imunologia.

Em 1949 o Dr H.Sherwood Lawrence descobriu que podia transferir imunidade para a Tuberculose de doadores portadores da doença para recetores saudáveis usando um extrato de leucócitos dos doentes com tuberculose. Este cientista denominou esta substância desconhecida do extrato como 'Fatores de Transferência' (FT). Já se publicaram variados ensaios, desde 1949 até à atualidade sobre o uso dos FT. Inicialmente os estudos eram divergentes e tanto se podia obter a cura completa como obter resultados negativos (5).

Esta divergência parece ser devida a vários fatores:

- I. A complexidade;
- II. O controlo de qualidade;
- III. Os prejuízos convencionais.

Os extratos de FT são complexos e contêm aproximadamente 200 ou mais FT individuais com pesos moleculares de 1-20 KDa (6). E aqui a sinergia entre todos parece ser a chave da eficácia. A separação dos constituintes de um produto natural habitualmente faz perder a sua eficácia (ex: Erva de S.João ou Hipericão) (3). A complexidade também se manifesta na variabilidade de resposta dos indivíduos, na necessidade de grandes quantidades de extrato de DLE para os testes in vivo e na inexistência de antígenos específicos. Relativamente ao controlo de qualidade foi dada uma patente a Wilson e Fudenberg devido às provas por estes criadas para determinar se o extrato tinha sido preparado corretamente (7). Ao desenvolverem este estudo Wilson e Fudenberg pretendiam:

- I. Determinar a especificidade dos antígenos;
- II. Selecionar potenciais doadores de fluidos, tecidos ou células dos quais se pode retirar o DLE que contem FT;
- III. Quantificar a potência de FT em várias preparações;
- IV. Testar a resposta dos doentes aos FT e extrapolar para uma resposta in vivo;
- V. Determinar dosagens e regimes terapêuticos de FT para administração em imunoterapia e imunoprofilaxia;
- VI. Monitorizar a resposta dos doentes sujeitos ao tratamento com FT.

Esta investigação permitiu estudar a eficácia e tornou possível a padronização das preparações que contem FT para um antígeno específico aumentando assim o seu potencial e previsibilidade de resultados. Para fazer este estudo

colocaram-se os leucócitos do doente com DLE contendo FT e antígeno específico. Posteriormente fizeram-se as medições da produção de mediadores celulares de imunidade para o antígeno em estudo. Desta forma conseguiram-se estudar as dosagens e os regimes terapêuticos aconselháveis. A avaliação da produção de mediadores de imunidade celular por linfócitos, macrófagos e monócitos sensibilizados por um antígeno específico pode ser feita através de:

- I. Ensaio de inibição de migração de leucócitos;
- II. Ensaio de inibição de migração de macrófagos;
- III. Ensaio das células T ativas (7);

Quanto aos prejuízos intelectuais acontecem frequentemente quando se introduzem novas descobertas e conceitos. A evolução das investigações sobre FT viu-se inibida pelos dogmas convencionais da Imunologia e da Biologia Molecular. Os anticorpos ou imunoglobulinas foram de máxima importância na demonstração de que as proteínas são específicas de cada espécie de organismo (8). Os anticorpos aparecem como resposta à introdução de uma proteína ou outra macromolécula estranha àquela espécie. Esta macromolécula designa-se por antígeno. O complexo anticorpo- antígeno denomina-se resposta imunitária e constitui a base da Imunologia (8). Este processo de resposta específica demora dias a semanas. Os FT não transferem anticorpos nem os criam diretamente, senão que a sua função é a de modelar e dirigir as células do sistema imunitário a reconhecer certos antígenos específicos (6). Os FT atuam de forma indireta cooperando com o sistema imunitário para que ele se torne mais competente nas suas respostas e atuam muito rapidamente (em menos de 24 horas) (6).

2.2. DEFINIÇÃO

Os FT são pequenas moléculas mensageiras imunológicas produzidas pelos organismos de nível superior (9). A sua função é transferir sinais de reconhecimento imunológico entre células imunológicas, ajudando assim a educar as células imunológicas ingênuas quanto a um perigo presente ou potencial. Os FT dos mamíferos, incluindo os humanos, são pequenas moléculas entre 3500 e 10000 Da (10). Os FT são nanomoléculas de polipeptídeos que consistem em sequências de 40 a 44 aminoácidos (11). Estas nanomoléculas têm aproximadamente oito resíduos de aminoácidos (12), que podem combinar-se para criar biliões (8^{18}) de FT diferentes. Os FT são peptídeos polares hidrofílicos que têm duas regiões: uma variável e uma constante (6).

Além de transferirem respostas imunitárias específicas, atuam sobre os canais de cálcio estimulando desta forma o transporte deste ião (6). Supõe-se que transportam a imunidade celular específica de antígeno do linfócito fonte (hipersensibilidade retardada) aos linfócitos não sensibilizados (6). Os FT transmitem a informação imunitária através de FT indutores, supressores e específicos de antígeno (6). Os FT induzem uma resposta imunitária em menos de 24 horas. Os FT supressores evitam as reações auto-imunes e controlam as alergias (6). Desta forma tanto o fator indutor como o supressor formam uma rede imunoreguladora que mantém equilibrado o nosso sistema imunitário (6).

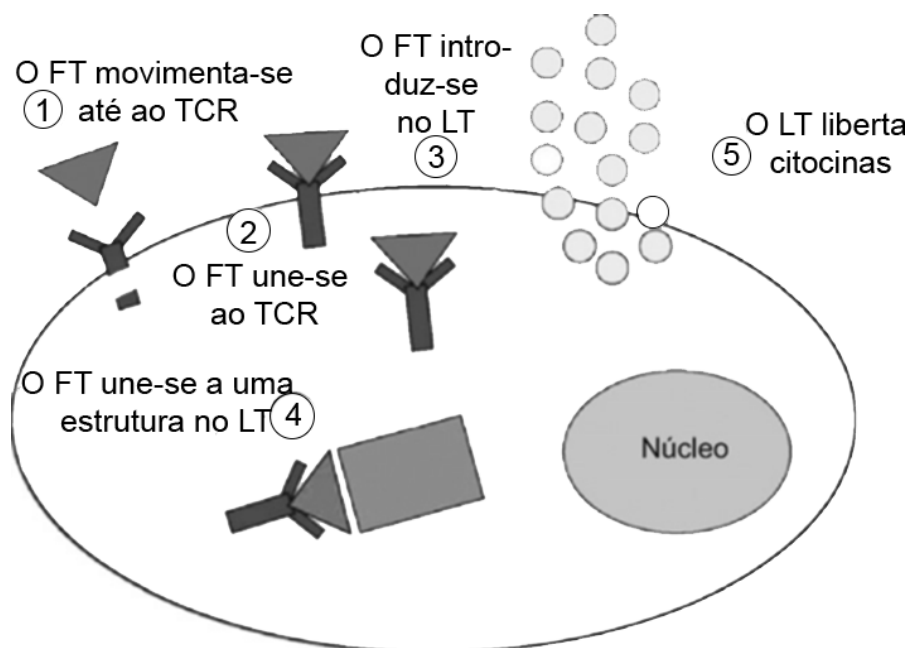


Fig. 1 – Passos de ativação do linfócito T (LT) pelos FT. TCR é o recetor de linfócito T(6).

A estrutura molecular ainda não foi determinada. Uma variedade de modelos moleculares foram propostos mas nenhum foi demonstrado (13). Vários investigadores sugeriram que os FT são compostos de um polipeptídeo e podem consistir em mais de uma cadeia ligada por pontes bissulfureto. Outros sugeriram que ligados às cadeias de polipeptídeos estão ácidos nucleicos ou fosfodiésteres (14).

Os FT não são específicos de espécie, permitindo assim que no humano sejam eficazes os FT de animais (5) porque não são imunogéneos nem atuam como antígenos (6).

2.3. ORIGEM

Os FT têm origem nos linfócitos T auxiliares, CD4+. Estas células contêm recetores especiais na sua superfície, aos quais um antígeno específico se pode ligar. Cada linfócito T auxiliar, CD4+, é capaz de libertar FT capazes de se ligarem ao mesmo antígeno ao qual se liga o Linfócito T auxiliar (1).

2.4. FONTES

As fontes são muito variadas desde os linfócitos do sangue periférico, nódulos linfáticos dos bovinos, baço e placenta de várias espécies. Os FT estão presentes em imensas espécies desde a galinha, pato, rato, coelho, burro, vaca, cabra, cavalo, cão, primatas e muitas outras espécies incluindo o Homem (12).

No entanto os FT são na maioria obtidos por ultrafiltração do colostro de mamíferos e da gema do ovo (15) (16). Antes da descoberta dos FT no colostro e na gema do ovo, os FT eram extraídos dos leucócitos humanos e depois eram injetados nos doentes, tornando a técnica dispendiosa e impraticável para a rotina. Por exemplo as mães (em todos os mamíferos) transferem a sua imunidade para o descendente através do colostro. Esta transferência da mãe melhora a imunidade do filho e muitas vezes é a diferença entre morte e vida do recém-nascido.

As vacas estão em contacto com imensos agentes infecciosos ao seu redor. Consequentemente produzem imenso colostro e bastante mais FT do que a sua cria necessita. O excesso desta produção serve para isolar FT que vai consistir numa abundante e benéfica fonte para o uso humano (17), devido a obter-se muito maior quantidade de DLE a baixo custo (12).

As aves no interior dos seus ovos têm um “arquivo” do Sistema imunitário, bem como os identificadores para fazer o ataque a um agente patogénico (18). As aves mais do que os animais de pasto estão em íntimo contacto com o seu meio ambiente (19), já que habitualmente se alimentam com insetos e vermes. É muito importante que esta experiência imunológica das mães seja transferida para os filhos e a única oportunidade para esta transmissão é durante a formação do ovo.

2.5. SEGURANÇA

Baseando-nos na literatura, desde a descoberta dos FT em 1949 não se têm quase reportado reações alérgicas ou outros efeitos secundários, mesmo quando injetados (1).

Alguns doentes referem alguns sintomas de constipação ou gripe durante períodos do seu primeiro mês de tratamento. Estes sintomas são devidos à reação do sistema imunológico (1).

Quando o organismo ataca um grande número de células infetadas num curto período de tempo, desenvolve-se uma reação tóxica, nomeada Jarish-Herxheimer. Esta reação provoca um aumento em citocinas inflamatórias durante o período de exacerbação incluindo a TNF- α , a IL-6 e a IL-8. Jarisch pensou que a reação era causada por uma toxina libertada pela morte de espiroquetas (20).

Geralmente esta reação é mais frequente em doentes crónicos e quando se inicia a toma com doses altas de FT. Para que esta reação não ocorra aconselha-se que estes doentes comecem com doses baixas de FT (1).

A administração oral é conveniente (21), segura (22) (23) e facilmente aceite (21) pelas crianças e pelos idosos.

2.6. OBTENÇÃO DE FATORES DE TRANSFERÊNCIA

Ainda recentemente os FT eram usados apenas em Hospitais. Eram produzidos a partir das células sanguíneas humanas em laboratório e não estavam disponíveis ao público. Eram administrados por via injetável. Na última década várias companhias começaram a utilizar processos patenteados para extrair FT do colostro da vaca e da gema de ovo. Estes extratos estão agora disponíveis ao público e a sua administração é por via oral. Havia alguns cientistas que contestavam vários estudos clínicos que tinham sido realizados com a administração de FT por via oral porque mencionavam que o meio ácido e enzimático do trato gastrointestinal destruiria os FT.

Foi realizado um estudo (13) em que se compararam as vias de administração subcutânea e oral e a conclusão é que a eficácia era igual. Apesar de alguns suplementos estarem diretamente disponíveis ao público, devem ser utilizados sob vigilância médica tais como todos os outros suplementos disponíveis no mercado.

A obtenção de FT do colostro e da gema de ovo foi um desenvolvimento assaz importante para o futuro do tratamento e prevenção de doenças (24).

Produtos disponíveis contendo FT*																																									
Researched Nutritionals (www.researchednutritionals.com)																																									
<i>Transfer Factor Multi-Immune</i>	<p>Produto com grande espectro de FT a partir de colostro de vaca e ovo de galinha, juntamente com uma grande variedade de ingredientes conhecidos por aumentar a saúde do sistema imunitário (B12, IP6, extrato de chá verde, cogumelos <i>shiitake</i> e <i>maitake</i>, entre outros.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Supplement Facts</th></tr> <tr> <th colspan="3">Serving Size: 2 Capsules Servings per Container: 30</th></tr> <tr> <th></th><th>Amount Per Serving</th><th>%Daily Value</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Folic Acid (as 5-methyl-tetrahydrofolate)</td><td>400 mcg</td><td>100%</td></tr> <tr> <td>Vitamin B-12 (as methylcobalamin)</td><td>250 mcg</td><td>4,167%</td></tr> <tr> <td>Zinc (as zinc citrate)</td><td>15 mg</td><td>100%</td></tr> <tr> <td>Selenium (as L-selenomethionine)</td><td>70 mcg</td><td>100%</td></tr> <tr> <td>NK Maximizer Bioplex™</td><td>1083 mg</td><td>*</td></tr> <tr> <td colspan="3">Transfer Factor NK+™ (a proprietary super blend of purified transfer factors and colostrum), Larch Arabinogalactan, IP-6 (inositol hexaphosphate), Shiitake 4:1 Extract, Maitake 4:1 Extract</td></tr> <tr> <td>Macrophage & T-Cell Pro Blend™</td><td>645 mg</td><td>*</td></tr> <tr> <td colspan="3">TMG, Beta Glucan, Astragalus 5:1 Extract</td></tr> <tr> <td>Healthy Cell GTP™</td><td>400 mg</td><td>*</td></tr> <tr> <td colspan="3">Green Tea Extract (standardized to 95% polyphenols, 75% catechins and 40% EGCG), Pomegranate Extract (standardized to 40% ellagic acid)</td></tr> </tbody> </table> <p>*Daily Value not established.</p> <p>Other ingredients: Gelatin (capsule shell), cellulose, silica</p>	Supplement Facts			Serving Size: 2 Capsules Servings per Container: 30				Amount Per Serving	%Daily Value	Folic Acid (as 5-methyl-tetrahydrofolate)	400 mcg	100%	Vitamin B-12 (as methylcobalamin)	250 mcg	4,167%	Zinc (as zinc citrate)	15 mg	100%	Selenium (as L-selenomethionine)	70 mcg	100%	NK Maximizer Bioplex™	1083 mg	*	Transfer Factor NK+™ (a proprietary super blend of purified transfer factors and colostrum), Larch Arabinogalactan, IP-6 (inositol hexaphosphate), Shiitake 4:1 Extract, Maitake 4:1 Extract			Macrophage & T-Cell Pro Blend™	645 mg	*	TMG, Beta Glucan, Astragalus 5:1 Extract			Healthy Cell GTP™	400 mg	*	Green Tea Extract (standardized to 95% polyphenols, 75% catechins and 40% EGCG), Pomegranate Extract (standardized to 40% ellagic acid)		
Supplement Facts																																									
Serving Size: 2 Capsules Servings per Container: 30																																									
	Amount Per Serving	%Daily Value																																							
Folic Acid (as 5-methyl-tetrahydrofolate)	400 mcg	100%																																							
Vitamin B-12 (as methylcobalamin)	250 mcg	4,167%																																							
Zinc (as zinc citrate)	15 mg	100%																																							
Selenium (as L-selenomethionine)	70 mcg	100%																																							
NK Maximizer Bioplex™	1083 mg	*																																							
Transfer Factor NK+™ (a proprietary super blend of purified transfer factors and colostrum), Larch Arabinogalactan, IP-6 (inositol hexaphosphate), Shiitake 4:1 Extract, Maitake 4:1 Extract																																									
Macrophage & T-Cell Pro Blend™	645 mg	*																																							
TMG, Beta Glucan, Astragalus 5:1 Extract																																									
Healthy Cell GTP™	400 mg	*																																							
Green Tea Extract (standardized to 95% polyphenols, 75% catechins and 40% EGCG), Pomegranate Extract (standardized to 40% ellagic acid)																																									
4Life Research (www.4life.com)																																									

<p><i>Transfer Factor Tri-Factor Plus</i></p>	<p>Produto com grande espectro de FT a partir de colostro de vaca e ovo de galinha, juntamente com uma grande variedade de nutrientes conhecidos por aumentar a saúde do sistema imunitário (beta-glucano, selénio, zinco e outros).</p>	<p>DIRECTIONS: Take two (2) capsules daily with 8 oz of fluid.</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Supplement Facts</th> </tr> <tr> <th colspan="3">Serving Size: Two (2) Capsules Servings Per Container: 30</th> </tr> <tr> <th>Amount Per Serving</th> <th></th> <th>% DV*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Zinc (as zinc methionine)</td> <td>10 mg</td> <td>70%</td> </tr> <tr> <td>4Life Tri-Factor Formula</td> <td>300 mg</td> <td>†</td> </tr> <tr> <td colspan="3">UltraFactor XF™ A proprietary concentrate of ultra-filtered 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from cow colostrum.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">OvoFactor™ A patented concentrate of 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from chicken egg yolk.</td> </tr> <tr> <td colspan="3">NanoFactor™ A proprietary concentrate of nano-filtered cow colostrum.</td> </tr> <tr> <td>Cordyvant™ Proprietary Polysaccharide Complex</td> <td>843 mg</td> <td>†</td> </tr> <tr> <td colspan="3">IP-6 (inositol hexaphosphate)</td> </tr> <tr> <td colspan="3">β-Sitosterol and other phytosterols</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Cordyceps sinensis mycelia extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Agaricus blazei fruiting body extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Aloe (Aloe barbadensis) leaf gel extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Oat (Avena sativa) seed extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Olive (Olea europaea) leaf extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Maitake (Grifola frondosa) fruiting body extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">Shiitake (Lentinus edodes) fruiting body extract</td> </tr> <tr> <td colspan="3">* Daily Value † Daily Value not established</td> </tr> </tbody> </table> <p>OTHER INGREDIENTS: Gelatin capsule and lemon peel powder. CONTAINS INGREDIENTS FROM MILK, EGG, AND SOY.</p>	Supplement Facts			Serving Size: Two (2) Capsules Servings Per Container: 30			Amount Per Serving		% DV*	Zinc (as zinc methionine)	10 mg	70%	4Life Tri-Factor Formula	300 mg	†	UltraFactor XF™ A proprietary concentrate of ultra-filtered 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from cow colostrum.			OvoFactor™ A patented concentrate of 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from chicken egg yolk.			NanoFactor™ A proprietary concentrate of nano-filtered cow colostrum.			Cordyvant™ Proprietary Polysaccharide Complex	843 mg	†	IP-6 (inositol hexaphosphate)			β-Sitosterol and other phytosterols			Cordyceps sinensis mycelia extract			Baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) extract			Agaricus blazei fruiting body extract			Aloe (Aloe barbadensis) leaf gel extract			Oat (Avena sativa) seed extract			Olive (Olea europaea) leaf extract			Maitake (Grifola frondosa) fruiting body extract			Shiitake (Lentinus edodes) fruiting body extract			* Daily Value † Daily Value not established		
Supplement Facts																																																														
Serving Size: Two (2) Capsules Servings Per Container: 30																																																														
Amount Per Serving		% DV*																																																												
Zinc (as zinc methionine)	10 mg	70%																																																												
4Life Tri-Factor Formula	300 mg	†																																																												
UltraFactor XF™ A proprietary concentrate of ultra-filtered 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from cow colostrum.																																																														
OvoFactor™ A patented concentrate of 4Life Transfer Factor® proteins and other peptides from chicken egg yolk.																																																														
NanoFactor™ A proprietary concentrate of nano-filtered cow colostrum.																																																														
Cordyvant™ Proprietary Polysaccharide Complex	843 mg	†																																																												
IP-6 (inositol hexaphosphate)																																																														
β-Sitosterol and other phytosterols																																																														
Cordyceps sinensis mycelia extract																																																														
Baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae) extract																																																														
Agaricus blazei fruiting body extract																																																														
Aloe (Aloe barbadensis) leaf gel extract																																																														
Oat (Avena sativa) seed extract																																																														
Olive (Olea europaea) leaf extract																																																														
Maitake (Grifola frondosa) fruiting body extract																																																														
Shiitake (Lentinus edodes) fruiting body extract																																																														
* Daily Value † Daily Value not established																																																														
<p>Biopharma Scientific (www.biopharmasci.com)</p>																																																														
<p><i>NanoPro PRP</i></p>	<p>Pó para batido contendo polipeptídeos ricos em prolina (FT). Utiliza um lípido especial que aumenta a absorção dos constituintes do produto.</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="3">Supplement Facts</th> </tr> <tr> <th colspan="3">Serving Size 18g (1 scoop)</th> </tr> <tr> <th colspan="3">Servings Per Container: 30</th> </tr> <tr> <th>Amount Per Serving</th> <th></th> <th>% Daily Value*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Calories 58</td> <td></td> <td>Calories from fat 5</td> </tr> <tr> <td>Total Fat <1 g</td> <td></td> <td>1%</td> </tr> <tr> <td>Saturated Fat <1 g</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Cholesterol 5 mg</td> <td></td> <td>2%</td> </tr> <tr> <td>Total Carbohydrate 4 g</td> <td></td> <td>1%</td> </tr> <tr> <td>Dietary Fiber 3 g</td> <td></td> <td>12%</td> </tr> <tr> <td>Sugar 1 g</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Protein 12 g</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Calcium 30 mg</td> <td></td> <td>3%</td> </tr> <tr> <td>Iron 54 mcg</td> <td></td> <td><1%</td> </tr> <tr> <td>Selenium 40 mcg</td> <td></td> <td>57%</td> </tr> <tr> <td>Sodium 73 mg</td> <td></td> <td>3%</td> </tr> <tr> <td>Reduced L-glutathione 50 mg</td> <td></td> <td>†</td> </tr> <tr> <td>PRP Enriched Colostrum 2 g</td> <td></td> <td>†</td> </tr> <tr> <td>Stevia Leaf Crystals (stevia rebaudiana) 150 mg</td> <td></td> <td>†</td> </tr> <tr> <td colspan="3">* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. † Daily Values not established</td> </tr> </tbody> </table> <p>Other Ingredients: Undenatured Whey Protein Isolate (WPI), Unprocessed Whole Colostrum (reduced fat) fortified with Proline Rich Polypeptides (PRP's), Dextrin (Dietary Fiber) from Non GMO Corn, Natural Flavors (plant based), Silica (flow agent), Xanthan Gum, Soy Lecithin, Lactase Enzyme.</p>	Supplement Facts			Serving Size 18g (1 scoop)			Servings Per Container: 30			Amount Per Serving		% Daily Value*	Calories 58		Calories from fat 5	Total Fat <1 g		1%	Saturated Fat <1 g			Cholesterol 5 mg		2%	Total Carbohydrate 4 g		1%	Dietary Fiber 3 g		12%	Sugar 1 g			Protein 12 g			Calcium 30 mg		3%	Iron 54 mcg		<1%	Selenium 40 mcg		57%	Sodium 73 mg		3%	Reduced L-glutathione 50 mg		†	PRP Enriched Colostrum 2 g		†	Stevia Leaf Crystals (stevia rebaudiana) 150 mg		†	* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. † Daily Values not established		
Supplement Facts																																																														
Serving Size 18g (1 scoop)																																																														
Servings Per Container: 30																																																														
Amount Per Serving		% Daily Value*																																																												
Calories 58		Calories from fat 5																																																												
Total Fat <1 g		1%																																																												
Saturated Fat <1 g																																																														
Cholesterol 5 mg		2%																																																												
Total Carbohydrate 4 g		1%																																																												
Dietary Fiber 3 g		12%																																																												
Sugar 1 g																																																														
Protein 12 g																																																														
Calcium 30 mg		3%																																																												
Iron 54 mcg		<1%																																																												
Selenium 40 mcg		57%																																																												
Sodium 73 mg		3%																																																												
Reduced L-glutathione 50 mg		†																																																												
PRP Enriched Colostrum 2 g		†																																																												
Stevia Leaf Crystals (stevia rebaudiana) 150 mg		†																																																												
* Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. † Daily Values not established																																																														
<p>ReGen Therapeutics (www.regentherapeutics.com)</p>																																																														
<p><i>Colostrinin™</i></p>	<p>Produto com polipeptídeos ricos em prolina (FT) provenientes de colostro de ovelha.</p>																																																													
<p>Legacy for Life (www.legacyforlife.net)</p>																																																														

<p><i>I26 Hyperimmune Egg</i></p>	<p>Pó para batido ou para juntar a saladas e iogurtes, extraído da gema e clara de ovos de galinhas expostas a mais de 26 patogénios. Por isso, contém pequenas porções de FT.</p>	<p>Serving Size: 1 scoop (4.5 g) Servings per Container: 31 Amount Per Serving (%DV*) Calories: 21.5 11% Calories from Fat: 13 * Total Fat: 1.5g 2.2% Saturated Fat: 0.6g 2.9% Cholesterol: 14.1mg 4.7% Protein: 2g 4.1%</p> <p>*Percent Daily Values are based on a 2,000-calorie diet.</p> <p>Ingredients: Egg powder with immune components*</p>
<p>* Lista não exaustiva de companhias nem de produtos</p>		

Fig. 2– Produtos disponíveis contendo FT adaptação (1)

Esta lista contém alguns dos produtos comercializados e não pretende ser exaustiva. Existe bastante investigação neste campo e produtos novos com FT estão a ser constantemente lançados no mercado. A demonstração deste facto é que existem várias patentes publicadas nestes últimos anos (2013-2015) de novos produtos incluindo FT (gel nutracêutico) derivado do colostro da vaca e ovo de galinha, produtos variados incluindo FT extraídos do baço do tubarão indicados no tratamento de patologias como a Asma, Vitiligo e como adjuvantes de vacinas virais aumentando assim a sua potência (25).

2.7. MECANISMOS DE AÇÃO

A resposta natural imunológica é a causa da produção dos FT que são produzidos nos linfócitos T auxiliares (CD4+). Estes quando um agente patogénico ataca o organismo tornam-se ativos na luta contra o mesmo, comunicando com outras células envolvidas no sistema imunitário para iniciar e coordenar os ataques. Estas células podem estimular a produção de anticorpos pelas células B, alertar as células T citotóxicas (CD8+) ou pedir a ação dos *Natural Killers* e fagócitos. Em suma, a atividade dos linfócitos T auxiliares são o ponto-chave para a atividade do sistema imunitário. Dependendo de como estas

células reagem à infeção a batalha imunológica dar-se-á por dois mecanismos denominados Th1(envolve a morte das células infetadas através da ação das células CD8+) e Th2(envolve a formação de anticorpos pelas células B) (15).

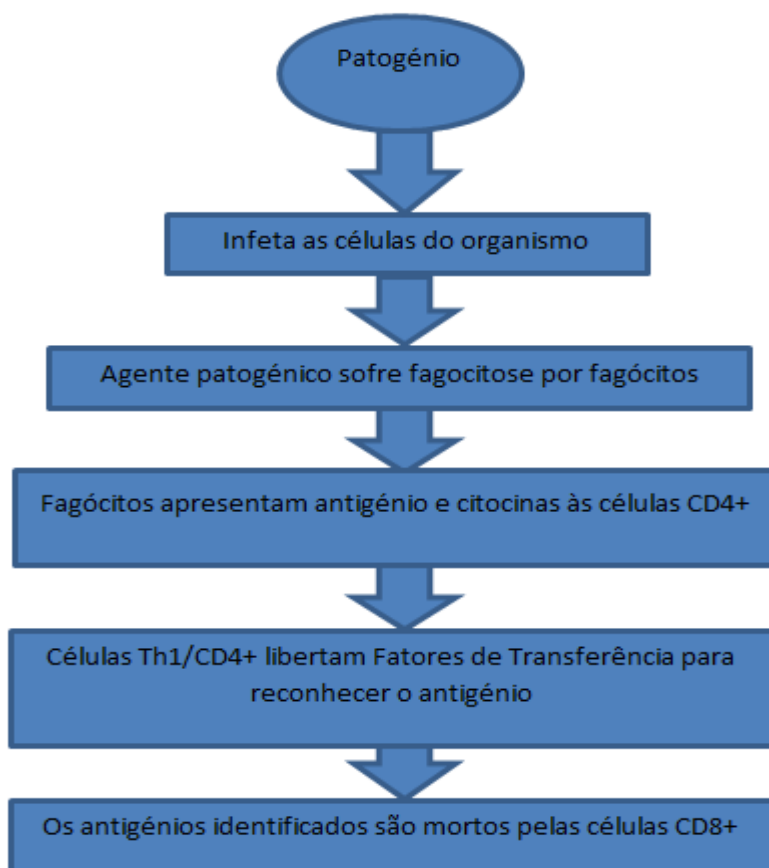


Fig. 3 – Síntese dos FT (15)

Os FT atuam através do mecanismo de libertação de citocinas a partir dos Th1. Num estudo (26) mediram níveis de várias citocinas através da administração oral de FT a alguns doentes. Das citocinas só aumentaram os níveis de interferão- gama (IFN gama). IFN gama é só produzido pelos linfócitos T auxiliares tipo 1 (TH1), células T citotóxicas e células *Natural Killer*, o que indica a especificidade dos FT pela ativação do mecanismo de resposta Th1. O IFN gama é uma citocina importante e poderosa porque pode combater viroses e células cancerígenas. Também pode originar novos leucócitos para se diferenciarem em células Th1, talvez explicando parcialmente como os FT conduzem ao recrutamento de novas células Th1 quando estas são necessárias (15).

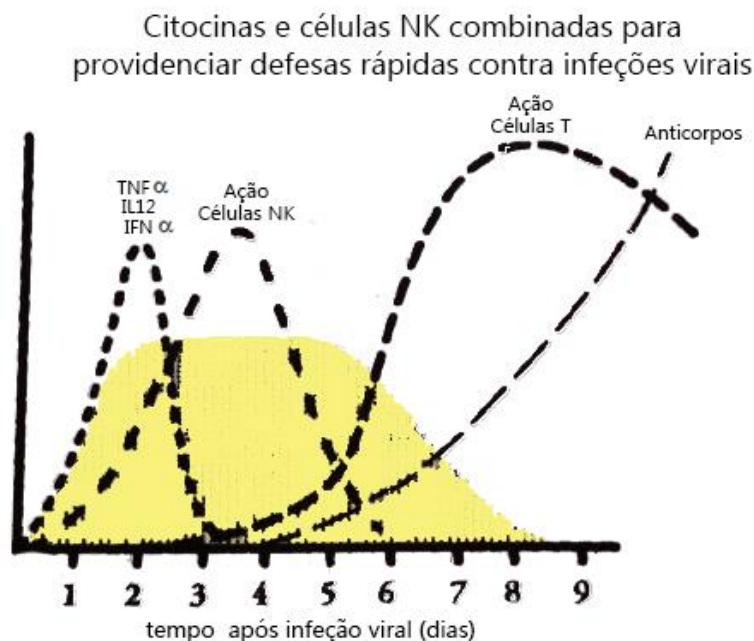


Fig. 4 – Sequência de eventos durante uma infecção viral e a resposta imunitária (27).

2.8. EDUCADORES DO SISTEMA IMUNITÁRIO - 3R's

Os FT são moléculas que fornecem informação para o reconhecimento do antígeno e seguidamente armazenam essa informação que denominamos memória imunológica. Para abreviar e facilitar a comunicação podem ser denominados Educadores (28).

Para lutar contra os agentes patogénicos o sistema imunitário deve fazer o seguinte:

- I. Reconhecer os agentes patogénicos;
- II. Reagir e organizar uma reação para erradicar o organismo causador da patologia;
- III. Recordar o antígeno de tal forma que no próximo contacto haja uma resposta rápida.

O reconhecimento dos agentes patogénicos é provavelmente realizada pela fração indutora dos FT, que atua nas células Natural Killer. Esta fração indutora também incrementa a resposta do nosso organismo através do aumento da função dos linfócitos T *auxiliadores* que têm um papel muito importante no combate a imensas infeções.

Uma cápsula de 200 mg de FT extraídos do colostro de vaca tem a capacidade de reconhecimento de mais de 3000 diferentes agentes patogénicos (29).

Os FT ativam a nossa proteção imunitária em 24 horas enquanto que as vacinas geralmente levam 10-14 dias a provocar as defesas do nosso sistema imunitário. Os FT atuam de duas formas para educar o sistema imunológico a reagir rapidamente perante a agressão de um agente patogénico. Uma das formas é a resposta a um patógeno específico tal como o *cryptosporidium protozoan* que pode ser patogénico para várias espécies e a outra resposta é a patógenos similares tais como as infeções provocadas pelo vírus da Herpes que difere de uma espécie para outra. Desta forma, os FT podem educar o sistema imunitário, reconhecendo e reagindo perante imensos agentes infecciosos relacionados mas não idênticos (29).

Os FT são um dos mais potentes mensageiros no nosso corpo, tendo três efeitos no sistema imunitário: indutor, antigénico específico e supressor (29).

2.9.USO DE FT EM DIFERENTES PATOLOGIAS

O sistema imunitário é um sistema versátil e que ajuda a reconhecer, reagir e recordar os agentes patogénicos invasores. Os FT influenciam as atividades de vários componentes imunológicos e também regulam as citocinas. O desequilíbrio na produção de FT conduz ao desenvolvimento de artrite reumatoide, cancro, Alzheimer, doença cardíaca, hepatite, entre outras (30).

Percentagem de Aumento das Células NK sobre a Linha de Base	Percentagem
Noni (Morinda citrifolia)	15%
Aloés (Aloe vera)	15%
Alho(Allium)	21%
Colostro Bovino	23%
Cogumelo Cordyceps (Cordyceps sinensis)	28%
Cogumelo Shitake(Shiitake)	42%
Equinácea(Echinacea)	43%
Hexafosfato de Inositol ou IP6	49%
FT de colostro bovino	103%
FT com fitoterapia	248%

Fig. 5 - Aumento de NK por Produtos Naturais (31).

Em fevereiro de 1999, a Associação Americana Nutracêutica publicou uma seleção de 196 produtos naturais selecionados entre 400 produtos testados (31). Estes testes pretendiam determinar quais os produtos que têm a capacidade de aumentar a função das células NK, células citotóxicas e linfócitos e além disso determinar o grau de toxicidade dos mesmos. Dos 196 produtos testados registaram-se aumentos de 10 a 48,6% na atividade das células NK. A fórmula de FT combinada aumentou a atividade das células NK em 248% aumentando assim a atividade contra infeções crónicas e agudas e atividade antiviral (31). Em relação à toxicidade, 97 produtos dos 196 eram tóxicos. Os FT em concentrações até cem vezes a dose recomendada não produziram efeito tóxico (31).

2.6.1. DOENÇAS DERIVADAS DE UMA EXACERBAÇÃO DO SISTEMA IMUNITÁRIO

2.6.1.1. ALERGIAS

As doenças alérgicas são um dos muitos desafios da medicina moderna. Estatísticas de todo o mundo mostram que esta patologia está a disparar (cerca de 20% da população). Na atualidade, uma em cada cinco pessoas sofre de algum tipo de patologia atópica. De acordo com as previsões da Organização Mundial da Saúde (OMS), no século XXI as condições atópicas terão o primeiro lugar na morbilidade geral. Ao mesmo tempo, os anti-histamínicos tradicionais disponíveis não são suficientemente eficazes; os seus efeitos estão limitados ao bloqueio parcial dos recetores da histamina e, frequentemente, têm efeitos adversos. Os mecanismos do desenvolvimento das alergias estão relacionados com uma alteração no decurso da diferenciação dos linfócitos T, uma menor atividade das células supressoras T e uma produção excessiva de IgE. O patamar final desta cadeia é a ativação e desgranulação dos mastócitos. É necessário encontrar uma forma de atuar nas diversas etapas destas reações atópicas. As citocinas que regulam a atividade das células supressoras podem ser as mais adequadas para conseguir esta finalidade. Os FT usados como substância biologicamente ativa ajudarão a modular as reações imunológicas locais e gerais das alergias tais como as reações atópicas da pele nas doenças caracterizadas por essas mesmas reações (32).

Um desequilíbrio entre o Th1 e Th2 parece ser a fonte principal para o desenvolvimento da Alergia. Outras subpopulações de linfócitos, tais como Th17, CD4, FoxP3 e linfócitos T reguladores Th9, podem também estar envolvidos na resposta alérgica (33). Os processos reguladores constituem uma possível solução terapêutica nas reações alérgicas através do restauro do equilíbrio no interior do sistema imunitário (33) .

Os FT podem restabelecer o equilíbrio entre Th1/Th2 e melhorar os mecanismos imunoreguladores dos doentes que o recebem (33). Os resultados demonstraram que os FT induzem a expressão de RNAm de IFN-gama, osteopontina, Rantes e hBD-2 em indivíduos saudáveis (33). Os FT foram utilizados para fazer o tratamento de uma variedade de disfunções imunitárias, como por exemplo as alergias. Os doentes que receberam FT em conjunto com a sua terapêutica, habitualmente têm uma melhor evolução clínica do que sem os FT. Também quando se complementa o tratamento usual das alergias com FT, fazemos com que sejam reguladas as respostas imunológicas e assim é possível alcançar uma mais rápida e melhor resolução das reações alérgicas (33).

2.6.1.2. DERMATITES ATÓPICAS

A pele atópica é uma pele genética e estruturalmente sensível e reativa. A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória de etiologia multifatorial, recorrente, e que causa um comprometimento expressivo da qualidade de vida nos doentes. Geralmente há uma associação com Rinite Alérgica e Asma. Caracteriza-se por prurido intenso, xerodermia, hiperatividade cutânea e lesões inflamatórias em localizações típicas, em função da idade do doente. Em doentes pediátricos atópicos, a inflamação é caracterizada por níveis elevados de IgE, incremento de libertação de mediadores proinflamatórios através dos basófilos e mastócitos, eosinofilia periférica e local, atividade bifásica Th1/Th2 com a libertação de citocinas (IL-4, IL-5, IL-13), GM-CSF e a IFN-gama causada pelas células Th1 (34) .

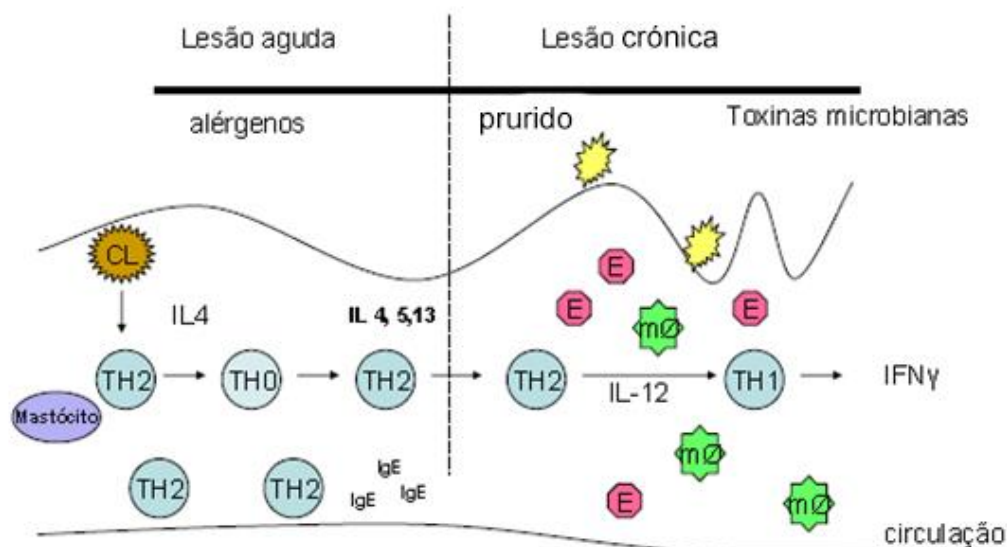


Fig. 6 – Esquema sumário da fisiopatologia da dermatite atópica (35)

Legenda: CL=células de Langerhans; E=eosinófilo; mØ=macrófago; TH2=linfócitos TH2; TH1=linfócitos TH1; IL=interleucinas; IFN γ =interferon gama; IgE=imunoglobulina

O termo atopia atualmente significa tendência pessoal e/ou familiar para tornar-se sensibilizado e produzir anticorpos específicos da classe IgE em resposta a alérgenos. A prevalência tem aumentado nos últimos anos e os fatores provavelmente implicados neste aumento de casos seriam a predisposição genética, poluição, infecções e exposição alérgica (36).

As infecções bacterianas, fúngicas e virais são comuns no curso da DA. O tratamento deve estar centrado em quatro pilares: o primeiro são os autocuidados, o segundo é a utilização de emolientes para repor a barreira cutânea, o terceiro os cuidados para evitar os fatores irritantes que pioram o quadro clínico e por último o tratamento medicamentoso propriamente dito (37).

A prevalência da DA tem aumentado nos últimos anos, e atualmente é de aproximadamente 20% da população mundial (38). É a doença de pele mais frequente na infância, constituindo 1% de todas as consultas em pediatria e 20% das consultas em dermatologia pediátrica (38). De acordo com os prognósticos da Organização Mundial da Saúde (OMS), no século XXI as condições atópicas manterão o primeiro lugar na morbidade geral.

A etiopatogenia da DA, não está totalmente esclarecida e tem sido demonstrada inter-relação complexa envolvendo fatores genéticos, imunitários, ambientais, psicossomáticos, farmacológicos e alteração da própria estrutura da pele (38).

Entre os fatores responsáveis pelo desencadeamento e/ou agravamento do quadro de DA, encontram-se os fatores ambientais (humidade, alteração de temperatura, entre outros), alérgenos (poeira, ácaros, epitélios de animais), agentes infecciosos (bactérias, fungos e vírus), alimentos, além do stress físico e emocional (38).

A maior compreensão sobre os mecanismos etiopatogénicos da DA, tem levado a novas propostas de tratamento, fazendo com que a terapêutica disponível inclua desde medidas gerais até ao uso de imunossuppressores. Para escolha adequada do tratamento, é importante a valorização da história clínica, com ênfase em fatores de agravamento do quadro clínico (38).

As lesões da pele podem ser modificadas por fatores psicológicos, infecciosos e imunológicos, de forma que a abordagem terapêutica é complexa (38).

Nos casos em que a dermatite atópica não responde às terapêuticas tradicionais são experimentadas terapêuticas alternativas.

Um dos estudos foi realizado em 1999 com duas terapêuticas alternativas, FT e Ciclosporina (39). Foram criados dois grupos. O primeiro foi submetido à terapêutica de ciclosporina e o segundo grupo à terapêutica de FT. A ciclosporina reduziu os níveis de CD4+ enquanto os FT aumentaram os níveis de CD8+. Além disso os doentes submetidos à terapêutica com ciclosporina tinham uma monitorização dos parâmetros do fígado e do rim enquanto o grupo submetido à terapêutica com FT não tinha que os efetuar. Ambas as terapêuticas apresentam mecanismos de ação diferentes e conseqüentemente a sua aplicação em conjunto pode ter vantagens terapêuticas para o doente, redução de custos e tratamentos prolongados com efeitos secundários mais reduzidos (39).

Foi realizado um estudo com vinte doentes com DA moderada e com idades entre 5 e 45 anos. Após dez semanas de tratamento com FT o nível de IgE e eosinófilos foi reduzido (40).

Noutro estudo realizado em 2005 foram examinados vários artigos em Medline e Embase relacionados com o tratamento da DA moderada ou severa com FT. Foram encontrados sete artigos com 121 doentes demonstrando uma diminuição

significativa nos sintomas do índice scorad, diminuição de IgE e dos eosinófilos em doentes tratados com FT. A conclusão deste artigo é que os FT são uma alternativa de tratamento para dermatite moderada e severa (41).

Noutro estudo, Leung reportou que o conhecimento acerca das causas imunológicas da DA tem importantes implicações clínicas para o diagnóstico e o possível tratamento devido à complexidade da patologia. Entre estes estava a talidomida e os FT como um tratamento imunomodulador com segurança e eficácia clínica (34).

Num estudo realizado entre 1994 e 1995 foram submetidos 30 doentes com DA (moderada a grave) a testes experimentais e comparativos. Após a administração de FT e feitas as comparações com base em testes laboratoriais demonstraram uma diminuição de CD4+, eosinófilos e a disseminação de IgE. Houve uma melhoria estatisticamente significativa nos 4 parâmetros: eritema, eczema, prurido e pápulas (42).

Realizou-se um estudo comparativo e experimental no Hospital “Lic. Adolfo López Mateos” no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia, no período de outubro de 1999 a outubro de 2000 (43). Incluíram-se dez doentes com diagnóstico de DA grave refratária, com idades compreendidas entre os 2 e os 45 anos, de ambos os géneros, e um grupo de dez doentes sãos como controlo. Realizou-se um controlo diário de sinais e sintomas dos doentes efetuado pelos mesmos. Os doentes registaram: eritema, prurido, pápulas e eczema, numa escala de valores entre 0 a 4+. Passados dez dias de administração dos FT houve melhoria clínica na maioria dos doentes mediante a diminuição de:

- I. grau de extensão da DA em 39.8%;
- II. intensidade de sinais em 32.3%;
- III. sintomas subjetivos em 18.2%;

Passados três meses de tratamento houve uma diminuição de 10.3% nos linfócitos, 46.7% nos eosinófilos e 23.8% nos basófilos. A diminuição dos eosinófilos é bastante relevante já que são células muito importantes na patogenia e perpetuação da inflamação nos doentes com DA. Concluindo, os FT produziram uma melhoria clínica importante nos doentes após 10 dias de tratamento com melhorias sintomáticas e de intensidade de sinais e extensão. Do ponto de vista imunológico observa-se modulação da resposta refletida na

diminuição de valores de linfócitos B (CD19), linfócitos T, CD4, CD8 e células NK (CD56) respeitantes aos inícios dos doentes com DA grave (43).

Realizou-se outro estudo para comparar a eficácia da talidomida e dos FT na dermatite atópica severa no Hospital “Lic. Adolfo López Mateos” no Serviço de Imunologia Clínica e Alergia (44). Foram incluídos 19 doentes (12 mulheres e 7 homens com idades de cerca de 30 anos). Foram distribuídos em dois grupos. No primeiro grupo de cinco doentes foi administrada talidomida (200mg/dia durante 6 meses). No segundo grupo foi administrado FT (15 unidades por via oral durante seis meses). Ambos os grupos verificaram uma melhoria estatisticamente significativa tanto a nível da extensão da DA como a nível da intensidade dos sintomas. Verificou-se desta forma que os FT se podem apresentar como alternativa de tratamento devido a serem tão eficazes como a talidomida nesta patologia tendo como vantagem a segurança dos mesmos (44).

2.6.1.3. ASMA

A asma é uma doença inflamatória crónica das vias aéreas que provoca hiperresponsividade das vias aéreas inferiores, limitando o fluxo aéreo. Essa inflamação provoca episódios de tosse, pressão torácica, sibilos e dispneia (45). A asma é uma doença grave que ocupa o primeiro lugar como doença respiratória crónica e é de elevada morbimortalidade. É provocada pela inalação, exposição ou sensibilização a uma ou a várias substâncias de natureza proteica que atuam como alérgenos (46).

No caso da asma extrínseca, motivo dos estudos realizados com FT, catalogada como uma hipersensibilidade do tipo 1 o fenómeno consiste em que um alérgeno se combina com dois fragmentos de imunoglobulinas do tipo IgE (46). Esta Imunoglobulina descoberta em 1967 é a responsável da alergia imediata. Ao ocorrer a união antígeno-anticorpo provoca mudanças enzimáticas intracelulares e libertação de mediadores químicos com ações farmacológicas que dão as características imunológicas da doença. Além disso é conhecida a associação na infância entre atopia, asma e alterações imunológicas. Outro dado importante é a associação que tem o aumento da IgE com as alterações imunológicas, tomando em consideração que esse anticorpo em condições biológicas atua como modulador da resposta imune celular (46). Um aumento da IgE, produz depressão do linfócito T supressor, tendo como consequência uma deficiência

nos mecanismos de defesa imunológica tanto humoral como celular, o que provoca uma estimulação deste sistema (46).

	Asma Extrínseca		Asma Intrínseca
	Atópica	Não Atópica	
Início dos sintomas	Geralmente na Infância	Adulto	Após 25 anos
Sintomas	Variável com o ambiente e estação do ano	Associado ao trabalho	Flutuações, cronicidade
Condições Associadas	Rinite Alérgica, Dermatite Atópica	Nenhuma	Pólipo nasal, bronquite, sinusite
História Familiar de Doença Atópica	Forte	Menor	Asma apenas?
Testes Cutâneos	Vários positivos, relacionados a história	Negativos ou uma reação somente	Geralmente negativo
IgE Total	Alta	Geralmente normal	Normal-Aumento em 30%
Eosinofilia	Alta durante a exposição ao alérgeno	Esporadicamente alta durante a exposição ao alérgeno	Alta
Prognóstico	Bom, especialmente evitando-se o alérgeno desencadeante	Bom, especialmente evitando-se o alérgeno desencadeante	Remissões incomuns

Fig. 7 – Tabela com as características de asma extrínseca e intrínseca (47).

Foram realizados vários estudos para avaliar a eficácia dos FT em doentes com asma.

Um dos estudos tinha como objetivo avaliar o efeito do FT na dose e o tempo de administração de glucocorticoides inalados em doentes pediátricos com asma alérgica moderada persistente. Para fazer essa avaliação foi realizado um ensaio clínico, aleatório, duplamente cego e controlado com placebo em doentes com idades compreendidas entre os 6 e os 18 anos (48). Ambos os grupos receberam glucocorticoides inalados (budesonida em sistema *turbohaler*) em dose média (400 µg/dia) e formoterol (fumarato de formoterol) 6 µg a cada 12h durante um mês. Incluíram-se onze doentes em cada grupo. O grupo a que foram administrados FT mostrou uma redução estatisticamente significativa na necessidade de glucocorticoides aos três meses de tratamento e manteve-se assim até ao final do estudo. Além disso este mesmo grupo apresentou melhores parâmetros nas provas de função pulmonar e menor grau de gravidade da asma no final do estudo. A conclusão deste estudo é que os FT ajudam a

diminuir a dose de glucocorticoides inalados em doentes com asma alérgica (48).

Num estudo realizado com cinquenta doentes foi administrado FT para controlar infeções repetidas em doentes com asma severa. Foi verificado um decréscimo bastante acentuado na ocorrência das infeções respiratórias e uma melhoria na asma. Os autores do estudo sugeriram que os FT podem reconstituir a função imunológica (49).

Noutro estudo escolheram-se 150 doentes entre 5 e 50 anos afetados com asma brônquica extrínseca dos quais 63 eram do sexo feminino e 67 do sexo masculino. Cento e trinta doentes foram tratados com FT e vinte foram tratados com soro fisiológico servindo de grupo controlo. Ambos os grupos utilizaram como terapêutica a aminofilina. Dos 130 doentes aos quais se administrou FT, 80 (61.6%) apresentaram melhoria clínica absoluta já que durante um ano de observação não se verificaram crises de broncoespasmo, 31 doentes (23%) diminuíram as suas crises tanto em periodicidade (menos de 6/mês) como em intensidade e 19 doentes não tiveram diminuição do número de crises embora seja muito importante realçar que as suas crises de broncoespasmo foram menos agressivas e de mais fácil solução comparativamente ao período em que não tinham a aplicação de FT e por isso não foi necessário hospitalização (46).

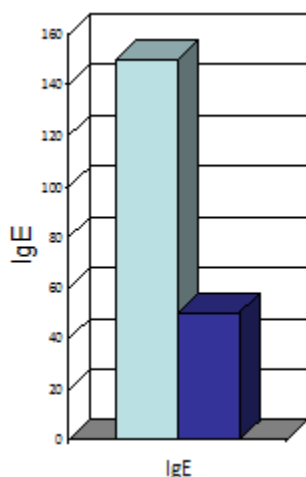


Fig. 8 - Resultados de IgE com e sem FT (46).

- Antes do tratamento
- Depois do tratamento

Do grupo ao qual se administrou FT, 99 doentes (76.2%) normalizaram os níveis de IgE que no início do estudo estavam elevados, 31 destes doentes (23.8%), não reduziram os seus níveis a valores normais embora houvesse tendência à normalização.

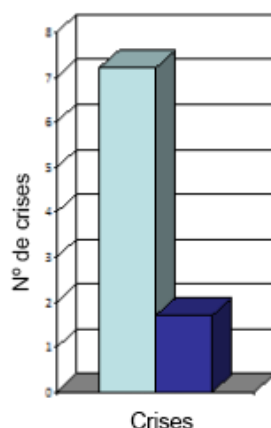
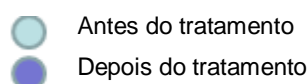


Fig. 9 - Resultado do número de crises com e sem FT (46).



2.6.2. DOENÇAS AUTOIMUNES

2.6.2.1. LÚPUS

Existem vários tipos de Lúpus. O lúpus *vulgaris* é uma lesão atenuada de tuberculose e afeta normalmente pessoas que tiveram contacto prévio com o *Mycobacterium tuberculosis*. É constituído por lesões dolorosas na pele com aparência nodular mais frequentemente na face em torno do nariz, pálpebra, lábios, bochechas e ouvidos (50).

Como o lúpus é uma doença autoimune e inflamatória utilizam-se geralmente medicamentos anti-inflamatórios como os corticosteroides (Prednisolona, hidrocortisona, dexametasona e metilprednisolona). Estes medicamentos possuem vários efeitos secundários entre os quais resistência à insulina, aumento da pressão arterial entre outros (51). Além destes medicamentos também se utilizam medicamentos anti-inflamatórios não esteroides, medicamentos anti palúdicos, medicamentos imunossuppressores entre outros (51).

Uma abordagem nova desta patologia visa o tratamento do sistema imunitário contrariamente a alguma terapêutica convencional em que faz uma supressão do mesmo. Como uma das causas é o intestino poroso (leaky gut) também se

faz uma abordagem nutricional (com restrição de alguns alimentos que provocam a inflamação do intestino e inserindo alguns probióticos naturais) para que haja um restabelecimento da função barreira do intestino (51). Inserida nesta linha de tratamento mencionam-se os FT provenientes do colostro bovino e da gema de ovo da galinha aconselhando-se doses de 1200 a 6000 mg/dia (51).

2.6.2.2. ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide é uma doença crónica, inflamatória, autoimune que se caracteriza pela inflamação das articulações e que pode conduzir à destruição do tecido articular e periarticular. Existe também uma ampla variedade de alterações extra-articulares (52).

A artrite reumatoide não é uma doença rara, a sua prevalência varia de 0,5-1,5% da população nos países industrializados. Em Portugal estima-se que afete 0,8 a 1,5% da população. A ocorrência global de artrite reumatoide é de duas a quatro vezes maior em mulheres do que em homens. O pico de incidência nas mulheres é após a menopausa, mas pessoas de todas as idades podem desenvolver a doença, incluindo adolescentes (52).

Entre 50-95% de adultos têm altos níveis de fator reumatoide ou IgM RF. Isto sugere que a inflamação é causada por uma elevada e aberrante resposta Th2 (1). Uma das citocinas proinflamatórias envolvida na resposta associada à artrite reumatoide é uma citocina Th1, o fator de necrose tumoral ou TNF. Muitos estudos de indústrias farmacêuticas focam a redução dos níveis de TNF (1). Os medicamentos disponíveis são na maior parte das vezes imunossupressores e têm bastantes efeitos secundários. (ex: metotrexato, hidroxycloquina, sulfazalina entre outros) tendo a finalidade de redução da sintomatologia e têm bastantes efeitos secundários (51). Além destes medicamentos em determinados casos também se utiliza terapêutica corticosteroide oral com a finalidade de reduzir a inflamação e a atividade das células do sistema imunitário tendo também bastantes efeitos secundários quando administrado em altas doses e por longos períodos de tempo entre os quais osteoporose, diabetes, hipertensão entre outros (51).

Uma abordagem nova desta patologia privilegia o tratamento do sistema imunitário como alternativa à supressão do mesmo indicando entre outros os FT (51). Além disso nesta abordagem também aconselha uma alimentação correta para evitar o intestino poroso que é uma das causas de cerca de 80% das

doenças autoimunes. Desta forma propõe-se uma alimentação com produtos biológicos não processados e a eliminação de glúten, de caseína, de alimentos ricos em ácidos gordos ómega 6 e de açúcar. Aconselha-se o uso de Probióticos naturais contidos em determinados alimentos e em suplementos alimentares principalmente com *Lactobacillus Reuteri* e *Grasseri* com a finalidade de que o intestino se desinflame. Também é proposta a toma de outros suplementos como por exemplo a melatonina, os ómegas-3, a CoQ10, a Glucosamina, a Condroitina entre outros. (51)

Uma abordagem nova desta patologia privilegia o tratamento do sistema imunitário como alternativa à supressão do mesmo indicando entre outros os FT (51).

Em alguns casos esta patologia tem tido melhorias com a utilização dos FT.

Em 1985 Georgescu reportou num estudo com 50 mulheres seguidas durante dois anos com o uso de anti-inflamatórios não esteroides e a injeção de FT 1 vez por semana nos primeiros seis meses e seguidamente 1 vez por mês. O autor do estudo reportou resultados “excelente, muito bom e bom” que foram obtidos em 35 doentes (70%) chegando à conclusão de que o tratamento com imunoterapia (FT) representa um importante adjuvante no tratamento da Artrite Reumatoide. A forma exata de como os FT exercem estes efeitos benéficos na Artrite Reumatoide ainda é desconhecida. É possível que os FT suprimam uma resposta hiperativa do sistema imunitário. Também é possível que os FT possam reduzir os níveis de TNF (1).

Em 2005, alguns cientistas em Cuba reportaram um estudo no qual foram referidos os efeitos dos FT nos níveis de citocinas incluindo o TNF. Os FT aumentam a atividade Th1 e o TNF é uma citocina de Th1 (1).

Os FT, quer em terapêutica conjunta ou isoladamente, revelam vantagens, dada a sua ação a nível do sistema imunitário.

2.6.2.3. ESCLEROSE MÚLTIPLA

A Esclerose Múltipla é uma doença inflamatória do Sistema Nervoso Central caracterizada pela múltipla localização de muitas placas de desmielinização na substância branca encefálica e medular. Estas lesões da bainha da mielina

levam a deficiência ou completa perda da transmissão do impulso nervoso causando assim sinais e sintomas neurológicos intermitentes que com a evolução da doença podem agravar-se progressivamente (53).

O que causa esta desmielinização é desconhecido mas a hipótese mais provável é haver um processo autoimune no qual as células do sistema imunitário atacam as células gliais que formam a mielina. Inicialmente a inflamação é transitória e ocorre novamente a mielinização mas não é permanente. A patologia é caracterizada por episódios de disfunção neurológica que habitualmente recuperam. À medida que a patologia avança começa a haver uma neurodegeneração crónica e extensa (1).

Geralmente esta patologia abrange mais mulheres jovens (entre 20 a 40 anos) que homens. Também pode ocorrer na adolescência ou na infância e abrange mais os caucasianos. A terapêutica para alterar o curso da doença tem falhado e somente tem atuado a nível da redução de sintomas. Os sintomas mais comuns incluem distúrbios visuais, distúrbios relacionados com perda de equilíbrio, coordenação e parestesias. Além disso a fadiga é um dos sintomas mais comuns. Outros sintomas que podem estar presentes é a disfunção da bexiga (53).

O tratamento tem três objetivos principais: tratamento de surtos, prevenção da progressão da patologia e tratamento das complicações. Os glicocorticóides constituem a primeira linha de tratamento na fase dos surtos. Como o sistema imune está envolvido na patogénese, a partir de 1993 os imunomoduladores começaram a fazer parte da terapêutica podendo alterar o curso e a progressão da doença (53).

Os medicamentos imunossupressores que se utilizam são os seguintes:

- I. Beta-interferão, com a finalidade de reduzir a inflamação e atrasar a progressão da patologia. Tem importantes efeitos adversos (51).
- II. Acetato de glatiramer, que é clinicamente eficaz e tem menos efeitos secundários que o anterior (51).

Os outros medicamentos utilizados nesta patologia são os seguintes:

- I. Mitoxantrona e Fingolimod: imunossupressores (51).
- II. Dalfampridine: medicamento recente, aprovado em 2010 e cuja finalidade é aumentar a capacidade das células nervosas de conduzir impulsos (51).

- III. Baclofeno e Tizanidina: relaxantes musculares esqueléticos para aumentar a espasticidade (51).
- IV. Amantadina: reduz a fadiga (51).

Se a Esclerose Múltipla é devida a uma imunodeficiência ou mesmo, segundo outra hipótese, a uma infeção intracelular, os FT que fortificam o sistema imunitário são uma hipótese de terapêutica ou prevenção. Inicialmente houve estudos que apesar da administração de FT não tinham melhoria do quadro clínico. No entanto, segundo um estudo de seguimento de doentes durante dois anos no tratamento desta patologia, foi demonstrado que os FT reduzem a progressão da mesma mas os resultados só apareceram passados 18 meses do início da administração (54). Após o termo do estudo, FT foi oferecido a todos os doentes mas só 45 é que aceitaram e foram seguidos durante mais três anos. Foi demonstrado que continuavam a ter uma progressão mais lenta da patologia. Ainda se fizeram mais estudos com 470 doentes com Esclerose Múltipla clinicamente definida num estudo aberto com FT. A taxa de progressão da doença também foi mais lenta (54).

2.6.2.4. PSORÍASE

A psoríase é classificada como uma doença autoimune, embora não haja evidências de um autoantigénio capaz de induzir ou estimular a propagação da doença (55).

A prevalência da psoríase varia de 0,6 a 4,8% na população mundial afetando homens e mulheres igualmente (56). Em Portugal afeta 1 a 3% da população, pelo que se calcula que existam entre 150 a 200 mil doentes com psoríase em Portugal. É mais frequente em adultos, entre a 2ª e a 3ª década de vida nas formas com tendência familiar, ou entre a 5ª e 6ª década de vida nas formas não familiares.

O seu aspeto, extensão, evolução e gravidade são muito variáveis, e pode-se entrar em remissão espontânea ou induzida pela terapêutica durante períodos de tempo maiores ou menores. Prurido e ardor acompanhados de dor são os sintomas comuns da pele psoriática. Em alguns casos mais graves as lesões podem causar fissuras e sangramento. Por outro lado, também podem ser assintomáticas. A psoríase caracteriza-se pelo aparecimento de lesões vermelhas, espessas e descamativas, que formam placas. Pode atingir apenas áreas limitadas da pele – cotovelos, joelhos, couro cabeludo ou outras

localizações (psoríase ligeira) – ou ser muito mais extensa (podendo atingir toda a pele), atingir áreas expostas ou ter compromisso articular (psoríase moderada a grave). Estima-se que os casos moderados a graves e com compromisso articular sejam cerca de 20-30% de todos os casos de psoríase. As unhas são também frequentemente afetadas, com alterações que podem variar entre o quase impercetível à sua destruição. A causa da psoríase é ainda desconhecida. Apesar de ser durante muito tempo dimensionada a uma simples doença da pele, sabemos atualmente que é geneticamente determinada (os genes ligados à psoríase incluem HLA-C, SLC9A3R1, NAT9, RAPTOR e SLC12A8) (57) e envolve alterações no funcionamento do sistema imunitário (aumento da atividade dos linfócitos T e das citocinas T auxiliares) (58) (59), que provoca inflamação e aumento da velocidade de renovação das células da epiderme (camada mais superficial da pele). Em estudos recentes de imunopatogenia, a psoríase tem sido considerada como uma doença inflamatória sistémica análoga a outras doenças inflamatórias imunes (60). Essa base imunomediada é comprovada pela eficácia de terapêutica indicada em doenças autoimunes (61). Num doente com psoríase, os queratinócitos, células da camada basal da epiderme (camada mais superficial da pele), que normalmente levam cerca de 28 dias a atingir a superfície cutânea, fazem-no em cerca de 5-7 dias, dando origem, desse modo a uma descamação contínua. Outros fatores externos que podem provocar ou agravar a psoríase são o stress, infeções, alguns medicamentos (carbonato de lítio, os anti-inflamatórios não esteroides e beta-bloqueantes), bem como o consumo de álcool e tabaco (62).

As células T reguladoras apresentam defeitos funcionais na psoríase, mas a causa é desconhecida. Atualmente, está-se a investigar o possível papel dos recetores de interleucina 1 na patogénese da psoríase, com ênfase em células T reguladoras e efectoras. Os dados sugerem que a expressão diferencial de genes da via da interleucina 1 em linfócitos T normais e psoriáticos pode indicar algumas alterações funcionais nestas células, que podem estar por trás da patogénese da psoríase. Foi identificado um novo gene RNA não-codificante denominado PRINS (*Psoriasis-susceptibility Related RNA Gene Induced by Stress*), que participa da suscetibilidade à psoríase e da resposta celular ao stress e estão ainda a trabalhar na sua caracterização funcional. Até agora, descobriu-se que o PRINS pode interagir com fosfoproteínas nucleares ou com nucleoplasmina e talvez regule, em associação com um complexo de ribonucleoproteína, a expressão de outros genes como o gene anti-apoptótico G1P3. A perda de regulação deste complexo pode contribuir para a

suscetibilidade à psoríase e para a proliferação anormal de queratinócitos observada nas lesões.

Níveis mais elevados de células Th17, Th22 e Th1 no sangue contribuem para o “fingerprint” da inflamação psoriática. Como a pele de doentes com psoríase apresenta altas concentrações de células Th17, Th22 e Th1, acredita-se que estes tipos celulares participem da patogénese da doença. Entretanto, ainda não se sabe ao certo quais as concentrações e tipos de células T inflamatórias no sangue e a importância relativa de cada tipo celular (63).

Existem diversos tipos de psoríase, classificados de acordo com o seu aspeto clínico.

O mais comum é a psoríase em placas que representa cerca de 90% de todos os casos.

Oito doentes (5 crianças e três adultos) com psoríase já bastante distribuída que já tinham resistência ao tratamento convencional foram sujeitos a um estudo com FT. Foi realizado um tratamento com FT por via oral com a seguinte posologia: 4 cápsulas/dia durante 14 dias e posteriormente 4 cápsulas/dia 2 vezes/semana durante 2 semanas. Sete doentes demonstraram uma marcada melhoria da pele após um mês de tratamento. Um dos doentes com história clínica de cinco anos de psoríase com agravamento nas articulações precisou de mais quinze dias de tratamento para alcançar resultados iguais aos anteriores (27).

2.6.3. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

2.6.3.1. FIBROMIALGIA

A fibromialgia (FM) é um síndrome caracterizado por dores muito incómodas e rigidez dos tecidos moles como músculos, tendões e ligamentos. Investigações demonstraram um distúrbio da microcirculação nos músculos afetados, um decréscimo de adenosina trifosfato e fosfocreatinina. As causas são desconhecidas e poderão ser diferentes consoante os doentes. A disfunção do sistema imunitário foi associada à fibromialgia. Existe um problema de ativação das células T nestes doentes.

As *guidelines* que nos são propostas pelo Colégio de Reumatologia Americano mencionam que um doente deve exibir 11 ou mais pontos ao longo do corpo para que lhe seja diagnosticada a fibromialgia (64).

A abordagem terapêutica desta patologia inclui os antidepressivos tais como a Duloxetina e Amitriptilina e um medicamento anticonvulsivante que é a Pregabalina. A finalidade destes medicamentos é a diminuição da dor. No entanto têm muitos efeitos secundários (51). Como alternativa a esta terapêutica pode ser utilizada a Vitamina D3 em altas doses, Vitaminas A,C,E, Vitaminas do complexo B, Ómega 3, CoQ10, Melatonina, Probióticos, FT entre outros (51).

Um estudo piloto foi realizado utilizando FT com ação conhecida em Epstein Barr e Citomegalovirus. Neste estudo dois de quarenta doentes demonstraram completa remissão enquanto que sete mostraram uma melhoria significativa. A disfunção imunológica é um fator importante na Fibromialgia. O envolvimento de infeções virais na maioria dos casos desta patologia levou os investigadores a propor estas infeções como causa inicial para grande parte destes doentes. Apesar de ainda não haver estudos conclusivos sobre o uso dos FT nesta patologia pode ser útil o seu uso sob a supervisão médica destes em casos individuais de Fibromialgia (64).

2.6.3.2. DOENÇA DE CROHN

A doença de Crohn (DC) apareceu como entidade clínica própria nos princípios do século XX. Ao longo do século a doença passou a ser reconhecida também em Pediatria tendo a sua incidência aumentado consideravelmente nos últimos 40 anos (65).

A DC é caracterizada por processo inflamatório crónico, persistente ou recidivante, de intensidade variável que pode acometer de forma descontínua qualquer parte do trato gastrointestinal de forma uni ou multifocal, que compromete não só a mucosa como também a parede intestinal, o mesentério e os gânglios linfáticos, podendo ocorrer de forma descontínua, em qualquer região do trato gastrointestinal, desde a boca até ao ânus. Trata-se de doença de etiologia ainda desconhecida que acomete pessoas de ambos os sexos em qualquer idade. Apresenta manifestações clínicas comuns a doenças infecciosas, e pode relacionar-se a desordens bacterianas, resposta imunológica exacerbada a um agente infeccioso presente no trato gastrointestinal, com desenvolvimento de obstruções intestinais, abscessos e fístulas, e provocando diarreia, dor abdominal e perda de peso. Os sintomas clínicos das doenças inflamatórias intestinais incluem diarreia crónica com presença de muco ou sangue, dor abdominal, perda de peso, febre, má absorção,

disfunção da barreira mucosa e fatores que causam deficiências nutricionais e funcionais, e dessa forma tornam fundamental a terapia nutricional. Morfologicamente a DC apresenta lesões segmentares, demarcadas e intercaladas com segmentos normais; úlceras aftosas, edema mucoso e submucoso e aumento de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Embora a DC tenha etiologia desconhecida, vários estudos relacionam a sua patogénese com a ação de fatores exógenos, fatores relacionados com o hospedeiro e/ou fatores ambientais específicos num indivíduo geneticamente predisposto para a doença, o que pode gerar um estado de disfunção imunológica da mucosa. Os CD4+ têm um papel preponderante na DC. A ativação e a proliferação dos linfócitos T após estimulação pelo antígeno é controlada pelas citocinas reguladoras (i.e. IL-10) e pela indução da morte celular programada. Os danos nos tecidos, resultantes da inflamação dos linfócitos T, são sanados através das citocinas pró-inflamatórias incluindo as TNF α . A nova terapêutica imunomoduladora nesta doença é baseada nestes princípios e foi demonstrado que a neutralização do TNF α pela administração de anticorpos monoclonais e IL-10 recombinante humano têm sido eficazes (66).

Trata-se de uma doença de ocorrência mundial, apesar de existirem variações da incidência e prevalência entre o plano geográfico. Ocorre frequentemente em países desenvolvidos, principalmente da Europa e América do Norte. Acomete, na mesma proporção pessoas de ambos os sexos e em qualquer idade, tendo maior incidência na segunda e terceira década de vida. A nutrição tem papel importante na perspetiva de melhoria do estado nutricional e clínico de doentes com DC, atuando na modulação das respostas inflamatórias e imunológicas, além de fornecer o suporte energético para manutenção da vida. Estudos mostram a possibilidade de intervenção nutricional que visem diminuir a atividade inflamatória da DC com o uso de nutrientes imunomoduladores, entre os quais se destacam nutrientes específicos como arginina, glutamina, ácidos gordos, nucleotídeos, além de probióticos e prebióticos. Em relação às propriedades terapêuticas de tais agentes imunomoduladores, têm sido demonstrados efeitos na resposta inflamatória quando eles são inseridos numa dieta convencional, os quais consistem em atenuação nos agravos intercorrentes em doentes com DC. Nesta doença, as respostas imunitárias inata e adaptativa são inadequadas, com incapacidade de reconhecimento e eliminação dos antígenos bacterianos, ativação exagerada e diminuição da apoptose das células Th1 e inativação de células Tr. Como resultado ocorre uma perda da tolerância à flora comensal e o desenvolvimento de mecanismos inflamatórios

exagerados. Um dos fatores que contribui para o desenvolvimento da DC é uma alteração da microflora intestinal, com diminuição da biodiversidade e aumento dos microrganismos patogénicos. Finalmente o ácido gordo ómega-3 mostrou-se positivo na diminuição da recorrência pós-cirúrgica na DC. Os probióticos aumentam a imunidade da mucosa intestinal, além de diminuírem a inflamação intestinal. A glutamina associada a frutooligosacarídeos pode abrandar a incidência de infeções e a ocorrência de translocação bacteriana e ainda manter a integridade intestinal. A arginina ajuda no processo de cicatrização, diminuição das taxas de infeção e do período de internamento além de aumentar a eficiência do sistema imunitário. Estes nutrientes têm apresentado propriedades terapêuticas importantes, com efeitos na resposta inflamatória e, quando inseridos numa dieta convencional, podem amenizar os agravos intercorrentes em doentes com DC (67).

O uso de imunomoduladores na DC mostrou-se positivo na recuperação dos processos inflamatórios e na reabilitação dos doentes, sendo que, a arginina e probióticos demonstraram-se eficazes no prolongamento da remissão da doença (68).

A terapêutica da DC tem que ter em consideração, entre outros elementos, a marcada heterogeneidade nos segmentos intestinais envolvidos, no comportamento predominante e na gravidade. Utilizam-se vários fármacos: salicilatos, corticosteroides, imunossuppressores e terapêutica biológica (67).

O uso dos salicilatos (salazopirina e messalazina) na DC foi reservado desde sempre para o tratamento da doença ligeira baseado nos dados iniciais dos estudos cooperativos, americano e europeu (67).

Os corticosteroides são habitualmente usados para tratar doentes com DC moderada a grave. Excetuam-se as formas tópicas e o budesonido, como as primeiras a serem usadas muitas vezes como complemento de outros fármacos e o segundo porque têm indicação na doença ligeira. O budesonido pode ser considerado como a primeira escolha para a DC ligeira a moderada localizada no íleo terminal e / ou cólon ascendente. Os doentes devem fazer terapêutica para prevenção de osteoporose (67).

Os imunossuppressores para os quais existe evidência de eficácia no tratamento da DC são a azatioprina / 6 mercaptopurina e o metotrexato. A 6-mercaptopurina e sobretudo o seu pró-fármaco azatioprina são os imunossuppressores mais utilizados. Embora seja consensual que a sua atuação se faz através dos metabolitos 6-tioguanina, o mecanismo de ação exato permanece desconhecido.

Existem estudos, incluindo duas revisões Cochrane, com resultados positivos tanto na indução da remissão como na terapêutica de manutenção (67).

A principal indicação para o uso da azatioprina são os doentes corticodependentes, nomeadamente aqueles que necessitam de dois ou mais ciclos de corticosteroides por ano, os doentes nos quais a diminuição da dose de prednisolona além dos 15 mg determina uma reagudização e aqueles em que se verifica uma recidiva precoce (6 semanas). Os doentes devem ser submetidos a análises periódicas (hemograma) para deteção de alterações hematológicas, sugerindo-se avaliações com intervalos de 1 a 2 semanas durante os primeiros dois meses, após os quais o intervalo será alongado para 3 meses. Para além da leucopenia o doente deve ser alertado para os efeitos secundários mais frequentes, nomeadamente um quadro de náuseas e dispepsia, muitas vezes autolimitado, a pancreatite aguda e a toxicidade hepática. Os riscos infeccioso e neoplásico, nomeadamente de linfoma também devem ser abordados (67).

O metotrexato é menos usado que a azatioprina na DC embora não haja qualquer evidência de que seja menos eficaz. Recomendam-se avaliações analíticas regulares (hemograma e bioquímica hepática) e a discussão dos efeitos secundários com o doente deve incluir, para além da mielotoxicidade (menos frequente que na azatioprina), a possibilidade de toxicidade hepática e ainda a teratogenicidade que contraindica a gravidez e a lactação durante a medicação. A periodicidade dos controlos analíticos pode ser semelhante à da azatioprina (67).

2.6.3.2.1. TERAPÊUTICA BIOLÓGICA

O Infliximab foi o primeiro agente biológico aprovado para o tratamento da DC. Trata-se de um anticorpo monoclonal quimérico dirigido contra o TNF α humano e que se aproxima já da sua primeira década de uso clínico. A sua eficácia em doentes com doença de comportamento penetrante ou inflamatório, independentemente da localização, encontra-se documentada em diversos estudos randomizados e controlados. Para além disso foi demonstrada a sua capacidade de promover a cicatrização da mucosa e a sua eficácia como terapêutica de manutenção, permitindo reduzir o número de internamentos e cirurgias abdominais. Não existem estudos randomizados que esclareçam definitivamente sobre a necessidade de associar imunossuppressores ao infliximab e sobre quando parar a terapêutica nos doentes em remissão (67) (68).

O infliximab deve ser utilizado em doentes que não respondam às terapêuticas de primeira e segunda linha, nomeadamente corticosteroides e imunossuppressores (67) (68) .

2.6.3.2.2. NOVAS TERAPÊUTICAS

Existem diversos fármacos em avaliação na terapêutica da DC. De entre os mais promissores pelos resultados alcançados nos ensaios clínicos destacam-se o adalimumab, o certolizumab e o natalizumab, com os dois primeiros a atuarem no TNF α e o último na integrina $\alpha 4$. Neste momento não é ainda possível apresentar recomendações formais para a sua utilização fora de ensaios ou programas de “compassionate use” (67).

Treze doentes que tinham DC e que não estavam a fazer terapêutica com esteroides e imunossuppressores concordaram fazer parte do estudo. Cinco homens e oito mulheres com idade média de trinta e quatro anos e com idades entre vinte e sessenta e cinco anos participaram no estudo. O teste de estimulação da phitohemaglutinina (PHA) foi realizado (69).

Os resultados mostraram que havia depressão da função das células T. Esta pode ser provocada pela nutrição inadequada. Após a administração de FT mostrou haver uma importante melhoria no PHA (69).

2.6.4. DOENÇAS DERIVADAS DE UM DÉFICE DO SISTEMA IMUNITÁRIO

2.6.4.1. INFEÇÃO

No final do século XX e princípios do século XXI surgiram muitas doenças infecciosas devido à proliferação de microrganismos patogénicos. O surgimento da SIDA e infeções graves respiratórias e outras fez com que se pensasse cada vez mais na importância da Prevenção (32).

As infeções virais e bacterianas existem numa percentagem bastante alta devido à resistência desenvolvida pelos microrganismos e também pelos desequilíbrios nos mecanismos de proteção do hospedeiro. Cada vez mais os Hospitais têm infeções Hospitalares graves que dificilmente combatem porque as bactérias são resistentes aos antibióticos disponíveis para terapêutica das mesmas. Nesta situação a única alternativa à vacina ou à terapêutica antimicrobiana é o uso de imunomoduladores que melhorem as funções específicas e não específicas da função do sistema imunitário. Estes podem ser muito úteis em situações de

urgência quando existem infeções graves ou quando está em causa um organismo desconhecido ou quando há um fracasso com a terapêutica convencional (32).

A situação em países em desenvolvimento é ainda pior do que nos países desenvolvidos. Por exemplo a Tuberculose e o VIH muitas vezes combinam-se numa associação letal e o resultado são milhões de mortes por ano.

Nas pesquisas do Dr William Hennen é referido que os FT podem baixar a taxa de crescimento bacteriano pelo que permite ao sistema imunitário ter mais tempo para preparar as defesas. Desta forma, o sistema imunitário tem mais tempo para produzir anticorpos específicos necessários para ganhar a guerra bacteriana (64).

Uma das patologias em que se usaram FT com sucesso foi no tratamento de cistites não bacterianas femininas. Muitos doentes mostram uma altíssima incidência de candidíases vaginais. Vinte e nove mulheres sofrendo desta patologia e nas quais os antibióticos e os anti-inflamatórios não esteróides são usados sem sucesso foram submetidos a terapia com FT. Nas primeiras duas semanas foi administrado duas vezes/semana e nos seguintes seis meses foi administrado uma vez/semana. Não foram observados efeitos secundários. Só uma doente sofreu de cistite recorrente (70).

Um artigo de revisão (71) cita que os FT foram usados com sucesso como adjuvantes ou terapia primária para vírus, parasitas, fungos e algumas infeções bacterianas. Da lista de infeções as que respondem melhor são as da família do Herpes. Na verdade para estas viroses foi demonstrado que pode prevenir a infeção. Além disso é muito importante o seu uso na prevenção e tratamento da SIDA e da Tuberculose como é citado nos capítulos em que se mencionam. E finalmente FT tem um potencial bastante interessante nas infeções causadas por agentes desconhecidos (71).

2.6.4.2. CANCRO

Cancro é um grupo de doenças que envolvem o crescimento celular anormal, com potencial para invadir e espalhar-se para outras partes do corpo, além do local original (72).

O cancro começa com uma célula que continua a sua replicação em vez de parar. Isto pode acontecer porque algo desencadeia a divisão celular ou porque falhou o sinal que deveria transmitir à célula para morrer.

Existem vários tipos de cancro:

- I. Leucemia (divisão aberrante dos leucócitos);
- II. Linfoma (divisão aberrante de células imunes nos nódulos linfáticos);
- III. Sarcoma (cancros que atingem as células da mesoderme como por exemplo a gordura, ossos ou células musculares);
- IV. Carcinoma (pulmões, mama, cólon, bexiga e próstata).

A conexão entre o Cancro e o sistema imunitário já é uma ideia com bastantes anos. Já no início do século anterior, em 1909, Paul Ehrlich afirmou que havia uma alta frequência de células tumorais que não danificam o nosso organismo devido à alta vigilância do sistema imunitário (2).

William B. Coley (médico em Nova Iorque), em 1890, ficou intrigado com o desaparecimento de tumores malignos em doentes com cancro que tinham contraído infeções estreptocócicas agudas (73). Ao suspeitar que a resposta natural do organismo à infeção bacteriana poderia ser a responsável da regressão do tumor fez uma experiência injetando estreptococos vivos num doente com cancro inoperável. A quarta cultura bacteriana produziu a remissão completa do tumor. Este cientista desenvolveu então as toxinas de Coley com uma mistura de bactérias mortas e com este preparado tratou mais de 1000 doentes com cancro. Como não havia homogeneidade de resultados este método foi abandonado. No entanto, devido a este estudo, William B. Coley é considerado o pai da Imunoterapia (73).

Dois cientistas, Lewis Thomas e Frank MacFarlane Burnet, cerca de cinquenta anos mais tarde retomaram a teoria de Paul Ehrlich e comunicaram que uma célula imunitária, a célula T (um tipo de linfócito) era o pivot da resposta do sistema imunitário contra o cancro (73). Desta forma falaram na “vigilância imune” para descrever a atitude permanente de alerta do sistema imunitário contra as células cancerígenas (73).

Após anos de polémicas, surgiram novos estudos elaborados por Robert D. Schreiber e os seus colegas da Universidade de Medicina de Washington em colaboração com Lloyd J. Old médico do Instituto Ludwig de Pesquisa de Cancro (73). Nesta pesquisa conclui-se que o IFN-gama e os linfócitos previnem o desenvolvimento dos tumores e inclusivamente o seu aparecimento, desenvolvendo assim uma função importante no combate ao Cancro (73).

Burnett e Thomas propuseram que o sistema imunitário continuamente defende o organismo da presença de células anormais que são destruídas quando são reconhecidas (73).

A maior parte dos tumores antes de serem clinicamente visíveis são destruídos pelo sistema imunitário. O sistema imunitário também tem outros papéis tais como atrasar o crescimento ou causar regressão de tumores estabilizados. Várias evidências são citadas para suportar estas ideias (2):

- I. Pesquisas pós morte sugerem que há mais tumores do que aqueles que são clinicamente conhecidos;
- II. Regressão espontânea de alguns tumores pode ocorrer;
- III. Os tumores ocorrem mais no período neo-natal e em idosos quando o sistema imunitário tem menos atividade;
- IV. Os tumores existem em maior número em indivíduos imunodeprimidos.

Já se realizaram cerca de 100 estudos dos efeitos de FT no Cancro tanto em doentes com cancro como em células cancerígenas em preparações in vitro (1).

Em 2006 cientistas do México, investigaram o extrato de leucócitos dialisado (DLE) retirado dos leucócitos de vacas para prevenir as células cancerígenas da mama da múltipla divisão e para facilitar a sua destruição (74). A experiência teve êxito e os investigadores demonstraram o efeito dose dependente do DLE. Quanto maior a dose, maior o êxito na destruição das células cancerígenas. Este extrato só atua em células danificadas e não prejudica as células saudáveis (74).

Em 2005, um estudo investigou o efeito dos FT num glioma, envolvendo células gliais em ratos. (75) Os resultados foram: “FT reduziu significativamente o tamanho do tumor e aumentaram CD2+, CD4+, CD8+ e células NK. Além disso também aumentou a percentagem de morte das células tumorais” (75).

Durante os tratamentos com radioterapia e quimioterapia pretende-se com estes afetar as células durante a sua rápida divisão e assim impedir o cancro de avançar. No entanto quando existem células anormais, as células imunes devem-se dividir rapidamente. Como a quimioterapia e radioterapia enfraquecem o sistema imunitário, este trabalho de vigilância deixa de ser efetuado.

Como os FT são capazes de criar novos linfócitos, o seu uso é eficaz para reparar o dano feito ao sistema imunológico pela quimioterapia e radioterapia. Estas foram as conclusões de cientistas em Cuba que investigaram o impacto

dos FT nos marcadores imunológicos em oito doentes a receber quimioterapia para a leucemia (76). Os FT aumentaram a recuperação dos números de leucócitos e a incidência de infeções durante o tratamento foi mais baixa (76).

Noutro estudo de 2008 também conseguiram demonstrar que os FT são poderosos adjuvantes no tratamento do cancro (74). Vinte e quatro doentes com cancro do pulmão foram divididos em dois grupos, um a receber quimioterapia e outro a receber quimioterapia e uma preparação de FT (CRP). O fato de ter administrado esta preparação induziu a atividade imunomoduladora (aumentando o total de leucócitos e as subpopulações CD4+, CD8+, CD16+ e CD56+) e aumentou a qualidade de vida dos doentes sugerindo a proteção imunológica contra os efeitos da quimioterapia. A conclusão é que a utilização dos FT (CRP) durante a radioterapia e a quimioterapia permite a manutenção do sistema imunitário e a qualidade de vida dos doentes (77).

Outros cientistas utilizaram os FT em doentes com Cancro (a maioria com leucemia) e com infeções que não respondiam à terapêutica habitual (78). Em dez doentes, sete deles conseguiram o controlo das infeções enquanto recebiam FT (78).

O melanoma é uma neoplasia maligna da pele mas com elevadíssimo índice de mortalidade. A quimioterapia e radioterapia têm uma resposta máxima de 20%. Neste contexto a imunoterapia com FT, é uma alternativa de terapêutica tanto isoladamente, como em conjunto. Num estudo realizado em 1980, com 64 doentes com melanoma maligno, foi-lhes instituída a terapêutica de melfalano, dacarbazina e FT durante 21 dias. Os doentes que tiveram a terapêutica com FT tiveram uma taxa de remissão de 20% (6).

Em junho de 2015 a Imunoterapia é uma das principais discussões do Congresso Anual da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (79). Num estudo apresentado na reunião anual comparando a quimioterapia padrão com o fármaco imunoterápico *Nivolumab*, os pesquisadores descobriram que pessoas com cancro do pulmão não-escamoso, apresentaram com o Nivolumab quase o dobro da taxa de sobrevivência (42%) do que os doentes de quimioterapia (24%) (80). Além de utilizarem a imunoterapia no combate contra o cancro de pulmão também estão a utilizar no melanoma com algum sucesso (79). Num estudo em que combinaram Nivolumab com Ipilimumab na terapêutica do melanoma já em

fase terminal concluíram que os tumores de 57.,6% dos doentes regrediram (81). Apesar de estarem muito confiantes nesta nova terapêutica, os médicos continuam a utilizar a quimioterapia em conjunto para desta forma terem mais sucesso (79).

A UCLA(Universidade da Califórnia em Los Angeles) que é pioneira em imunoterapia para o Cancro uniu-se a cinco outros pioneiros nesta área do Instituto Parker nos EUA para maximizar o potencial desta Pesquisa (82). Segundo John Mazziotta, vice-chanceler das Ciências da Saúde do UCLA, a imunoterapia na área do Cancro é um dos avanços mais importantes da nossa era, sendo agora consensual, que o nosso Sistema Imunológico é um mecanismo muito importante para o combate desta Patologia.

Em conclusão as possibilidades terapêuticas dos FT na imunoterapia do Cancro são uma alternativa a considerar (6), tanto a nível de terapêutica em conjunto com a quimioterapia e radioterapia, como a nível de prevenção de efeitos secundários dos mesmos. Sem dúvida são necessários mais estudos clínicos controlados para determinar os mecanismos de ação, doses terapêuticas ou efeitos secundários (6).

2.6.4.3. TUBERCULOSE

A tuberculose constitui, no início do século XXI, um dos maiores problemas mundiais de saúde pública tendo sido declarada uma emergência pela Organização Mundial de Saúde. Morrem mais pessoas por tuberculose em todo o mundo, do que por qualquer outra doença infecciosa curável. Calcula-se que a cada ano que passa, surjam mais 9 milhões de casos de tuberculose e que destes, 1.,8 milhões acabem por morrer (4). Este facto levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar a tuberculose como uma emergência mundial. Feita há dez anos atrás, esta declaração foi a primeira do género na história da OMS, tendo gerado um efeito positivo em várias áreas de atuação e junto de várias instituições e financiadores internacionais (4) .Em relação à União Europeia, Portugal é um dos países com maior incidência de casos notificados e com maior expressão dos aspetos que lhe conferem o carácter de infeção emergente.

A tuberculose é causada por dois tipos de micobactéria: *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. Estas bactérias não têm paredes celulares como as bactérias normais. Isto permite que elas não sejam detetadas pelo

sistema imunitário. Estas micobactérias são sensíveis a alguns antibióticos (associação de três ou quatro) e o tratamento é prolongado (cerca de seis a nove meses) (83) (84). A descoberta dos FT pelo Dr. H.S. Lawrence foi realizada quando ele transferiu imunidade (IMC) de um doente que tinha estado exposto à Tuberculose para um que ainda não tinha estado exposto (1).

Dada a emergência da Tuberculose a nível mundial e de Portugal, se as micobactérias se tornarem resistentes à antibioterapia disponível, os FT poderão proteger as pessoas que ainda não foram expostas à infeção ou pelo menos diminuir a severidade da mesma.

2.6.4.4. VIH

Desde que foi diagnosticada em 1983, infeções com VIH provocaram a morte de mais de vinte milhões em todo o Mundo (1). Este vírus primariamente infeta as células T *auxiliadoras*. Liga-se às membranas destas células e depois injeta o vírus no seu interior. Consequentemente os linfócitos T auxiliares são em menos quantidade e menos funcionais provocando uma deficiência do sistema imunitário o qual fica sem defesas para o combate contra o VIH. Ao infetar os linfócitos T auxiliares, o vírus também infeta as células NK e os macrófagos (1). O avanço da patologia provoca a diminuição das células CD4+. Numa pessoa saudável as células CD4+ têm valores de 800 a 1200/mm³ de sangue. Quando estas células se reduzem a menos de 200/mm³ o doente fica mais vulnerável às infeções oportunistas e cancros. Muitos cientistas pensam que o VIH provoca a SIDA pela indução direta da morte de células CD4+ ou interferindo na sua função normal (85).

Um grupo com 35 doentes infetados com VIH foi envolvido num estudo para verificar a eficácia dos FT nesta patologia. Vinte e cinco receberam só FT e dez receberam o *Cycloferon* servindo como Grupo Controle. Aproximadamente metade do grupo suplementado registou um aumento significativo nas células CD3, CD4 (35%) e CD8 (21%). O ratio CD4/CD8 aumentou 22%. Toda esta série de indicadores demonstram a melhoria da competência do sistema imunitário. No grupo controlo, os parâmetros acima mencionados sofreram um decréscimo ou permaneceram inalterados (86).

A maior parte do dano feito pelo VIH vem da infeção e morte dos CD4+ embora alguns investigadores acreditem que a diminuição dos Linfócitos T auxiliares ocorre devido à exaustão do sistema imunitário enquanto tenta lutar contra o

VIH. Este vírus é capaz de mutações rápidas o que torna difícil o tratamento e a prevenção com vacinas. Uma longa cadeia é envolvida na replicação e velocidade do VIH, o que torna possível aos cientistas numerosas opções de terapêutica. Algumas bloqueiam a ligação dos vírus com os CD4+. Outras previnem a inserção do material genético do VIH no DNA do hospedeiro. Muitos dos fármacos aprovados pela FDA para o tratamento do VIH trabalham através da interferência na replicação viral. Como a patogénese do VIH e a sua Progressão estão incluídos na resposta imunológica Th1, parece lógico esperar que os FT possam ser poderosos adjuvantes no tratamento fazendo aumentar os níveis de CD4+, CD8+, NK e macrófagos (86).

Fizeram-se alguns estudos para avaliar a eficácia dos FT no tratamento do VIH/SIDA.

Num estudo no qual foi administrado FT numa formulação oral específica para o VIH, associado à terapêutica antiviral, a 25 doentes com esta patologia, durante 60-1870 dias, notaram-se melhorias clínicas ou uma estabilização dos marcadores clínicos em 20/25 doentes. A conclusão retirada foi que os FT associados aos medicamentos antivirais são bem tolerados e têm vantagens terapêuticas (87).

Noutro estudo compararam diretamente grupos em que um recebia terapêutica antiviral e outro recebia a mesma combinada com FT específicos para o VIH. Os doentes que receberam a combinação de terapêuticas (Zidovudina e FT) tiveram um maior incremento de CD8+ e de níveis de interleucina-2 (um mensageiro imunológico importante que promove a génese de células T e promove a resposta Th1). No entanto não houve diferença de níveis relativamente aos CD4+ (88).

Em 2002, um estudo realizado por cientistas do Ministério da Saúde e Desenvolvimento Social da Federação Russa também sugeria que os FT poderiam ter um papel muito importante no controlo do VIH (86). Os pesquisadores examinaram contagens de células imunes em doentes com VIH administrando um suplemento oral de FT. Cinquenta doentes receberam FT somente como terapêutica e dez doentes num grupo controlo tiveram terapêutica com antivirais. O tratamento durou sete dias e as medidas foram feitas uma semana mais tarde. A maioria dos doentes no grupo da terapêutica com FT aumentou os níveis de Linfócitos (13 doentes), de CD3 (15 doentes), CD4 (14 doentes) e CD8 (12 doentes), de IL-1b e de IFN-7 (em todos os doentes). No

grupo controlo, as alterações positivas ocorreram tanto quanto as negativas. As conclusões dos autores foram de que os FT melhoravam o sistema imunitário dos doentes infetados com VIH e podem ser recomendados no combate da patogénese da doença. No entanto são necessários mais estudos para determinar a terapêutica ótima, a necessidade de repetição de tratamento e a frequência da terapêutica.

Dois estudos mais recentes do Centro de Pesquisas Biológicas em Havana (Cuba) sugeriram que os FT provavelmente interferem diretamente na replicação do VIH (89).

Se os mecanismos que provocam este efeito forem identificados poderá ser possível produzir FT com uma atividade superior contra a replicação do VIH. Estas preparações poderão ser extremamente úteis quando combinadas com outros antivirais habitualmente utilizados. Dada a sua segurança, a sua eficácia nos níveis das células T e a libertação das citocinas e o seu baixo custo, os FT podem ser selecionados para os doentes VIH/SIDA, principalmente para aqueles que não têm outras hipóteses de tratamento por razões económicas.

A administração de FT mesmo em curto prazo melhora o sistema imunitário do doente infetado com VIH (86).

2.6.4.5. HEPATITES B e C

A infeção pelo vírus da hepatite B (VHB) é um dos mais sérios problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que existam, aproximadamente, 240 milhões de portadores crónicos desse vírus distribuídos em várias regiões do mundo (90). O VHB é um vírus envelopado pertencente à família *Hepadnaviridae* cujo material genético é armazenado sobre a forma de DNA dupla fita. É transmitido, principalmente, pelas vias parenteral e sexual. O curso natural da hepatite B pode ser dividido em três fases: imunotolerante, imunoativa e não replicativa. O vírus secreta três tipos de antigénios (AgHBs, AgHBc e AgHBe) que, juntamente, com seus respetivos anticorpos, ajudam no diagnóstico da doença e na identificação das suas fases. As respostas imunes humoral e celular estão envolvidas na eliminação do vírus e na cura da infeção aguda. Embora não seja um vírus citopático, os mecanismos de defesa desencadeados produzem agressão ao fígado e, como consequência, lesões hepáticas necróticas e inflamatórias. Diversas síndromes extra-hepáticas são associadas com a infeção

crónica pelo VHB e contribuem, significativamente, para a morbilidade e mortalidade (91).

A hepatite C é uma das principais causas de doença hepática crónica em todo o mundo. Estima-se que existam, aproximadamente, 150 milhões em todo o mundo (90). Os principais fatores de risco para a infeção pelo VHC são a transfusão de hemoderivados de doadores não rastreados com anti-VHC, uso de drogas intravenosas, transplante de órgãos, hemodiálise, transmissão vertical, exposição sexual e ocupacional (92).

Os mecanismos imunitários quando não estão em equilíbrio desempenham um papel importante na patogénese da Hepatite viral B e C. Apesar da considerável experiência no tratamento de hepatites virais, incluindo as crónicas, todavia estão a ser discutidos um certo número de temas que se referem a um regime ótimo de tratamento. Os tratamentos mais atuais (ex: Harvoni) têm a duração de 3 a 6 meses. Como cada embalagem deste medicamento tem o valor de P.V.P de 17080.38 euros, o valor total do tratamento pode variar entre 51241.14 e 102482.28 euros (93).

O primeiro resultado obtido de doentes adultos que receberam FT juntamente com a terapia convencional testemunha uma alta efetividade do uso das citocinas celulares nesta classe de patologia (94). Juntamente com a normalização dos valores bioquímicos e a diminuição da carga viral (62% dos casos), todos os doentes mostraram uma marcada melhoria do estar geral, foram mais eficientes e não experimentaram um excesso de fadiga (94). Vinte e quatro doentes com Hepatite B aguda e vinte e quatro doentes com Hepatite C crónica receberam FT por via oral durante 14 dias. Quinze doentes com Hepatite C crónica receberam 3.000.000 UI de interferão que os doentes habitualmente recebiam 3 vezes/semana. Nos doentes que receberam FT houve sinais dinâmicos positivos mais cedo. Os efeitos imunocorretores foram idênticos no grupo que recebia FT por 14 dias e no grupo que recebia terapia com IFN durante três meses. A incidência de remissão viral nos grupos que receberam FT e IFN foi a mesma, cerca de 65%. Além disso os doentes que receberam FT tiveram um aumento de níveis de energia e de bem estar. Os FT foram recomendados como um tratamento alternativo aos interferões recombinantes ou para administrar em conjunto com as terapêuticas convencionais para as hepatites virais (94).

Os dados obtidos indicam que se deveriam realizar novos estudos sobre a eficácia dos produtos FT com o fim de desenvolver programas mais efetivos de tratamento, eficácia farmacológica, dosagem e aspetos económicos (32).

2.6.4.6. HERPES E OUTRAS DOENÇAS VIRAIS

Há cerca de oito tipos de Herpes, incluindo o Herpes simplex 1 e 2, o Herpes zoster, o citomegalovirus, o vírus Epstein-Barr que causa mononucleose, e outros. O herpes é uma doença viral na maioria das vezes benigna (2).

A maioria dos medicamentos prescritos para o tratamento do Herpes tem como substância ativa o *aciclovir*. Este medicamento quando tomado diariamente reduz a frequência e a duração das ocorrências. Quando tomado somente para as fases agudas diminui a duração mas não tem impacto na frequência das ocorrências durante o ano.

A atividade inibitória do *aciclovir* sobre o VHS-1, VHS-2, VVZ, VEB e CMV é altamente seletiva. A enzima timidinacina de células normais não infectadas, não utiliza eficazmente o *aciclovir* como um substrato, consequentemente, a toxicidade para células hospedeiras de mamíferos é baixa; no entanto a timidinacina codificada pelo VHS, VVZ e VEB converte o *aciclovir* em *aciclovir* monofosfato, um análogo de nucleosido, o qual é de seguida convertido em difosfato e finalmente em trifosfato, por enzimas celulares. O *aciclovir* trifosfato interfere com a ADN polimerase vírica inibindo a replicação do ADN vírico e resultando na terminação da cadeia após incorporação no ADN vírico. Este vírus insere o seu próprio ADN dentro do ADN das células do hospedeiro e desta forma há a replicação dos vírus. O *aciclovir* interrompe o processo (95).

No entanto, como o *aciclovir* interfere diretamente com a replicação dos vírus e não modifica o sistema imunitário, o seu efeito é de curta duração e o medicamento tem que ser tomado frequentemente para ser efetivo. Se a infeção resultar de um sistema imunitário mais debilitado o *aciclovir* não irá atuar nas causas.

A eficiência dos FT para prevenir ou controlar o vírus Herpes simplex foi demonstrada por numerosos estudos clínicos e estudos em animais. Um estudo examinou a eficácia dos FT para prevenir ocorrências em 16 doentes com viroses recorrentes causadas pelo Herpes simplex tipo 1 (herpes labial) e observaram os seguintes resultados: 8 doentes ficaram completamente livres da

patologia enquanto que os outros 8 reduziram o número de episódios durante o período de observação (96).

Efetuiu-se outro estudo, em que se administraram FT a vinte doentes que sofriam de Herpes simplex recorrente-HSV1. A maioria dos doentes já tinha sido tratado com *aciclovir*. As observações do estudo concluíram que os FT são a terapêutica de eleição porque reduziram a frequência e a duração dos surtos de Herpes simplex 1(97).

Em 1998 o mesmo grupo de investigadores reportou conclusões de um estudo em que compararam diretamente a eficácia dos FT e o *aciclovir* nas recorrências de Herpes Zoster. Neste estudo em vinte e oito doentes com surtos graves de Herpes Zoster foi administrado FT (14 doentes) ou *aciclovir* (14 doentes) por sete dias e monitorizados por mais 14 dias. O estudo foi duplo cego. Os FT foram superiores ao *aciclovir* na diminuição da duração dos surtos e na diminuição da duração da dor. Quanto aos resultados laboratoriais houve um aumento de CD4+ e IFN-gama (98).

Várias novas viroses da gripe com potencial pandémico foram identificadas nos últimos vinte anos. Uma das mais recentes foi a H1N1. Quando existe uma nova virose não existem quase antivirais efetivos.

Outra virose recente é a doença do vírus Zika que é causada por um vírus transmitido pelos mosquitos Aedes. Atualmente não existe qualquer tratamento específico nem vacina (99).

O uso de FT específicos para a prevenção e tratamento destas viroses mais letais e recentes pode ser considerada uma alternativa à produção massiva de novas vacinas em espaços de tempo curtos.

As pesquisas em animais de laboratório demonstraram os efeitos dos FT específicos contra as viroses (71).

2.6.4.7. DREPANOCITOSE OU ANEMIA FALCIFORME

É uma patologia hematológica de caráter genético que foi descrita pela primeira vez em 1910 por Herrick. É mais frequente, mas não exclusiva, em indivíduos de origem africana e é originada por uma mutação no cromossoma 112 que resulta na substituição de um ácido glutâmico pela valina na posição 6 da extremidade N-terminal na cadeia β da globina, dando origem à hemoglobina S. Os eritrócitos cujo conteúdo predominante é a hemoglobina S assumem, em condições de

hipóxia, forma semelhante à de uma foice e daí o nome falciforme decorrente da polimerização da hemoglobina (100).

Os glóbulos vermelhos em forma de foice não circulam adequadamente na microcirculação, resultando tanto em obstrução do fluxo sanguíneo capilar como na sua própria destruição precoce. Este mecanismo fisiopatológico acarreta graves manifestações clínicas, com maior frequência após os 3 meses de idade. Durante os 6 primeiros meses de vida, esses indivíduos são geralmente assintomáticos devido aos altos níveis de hemoglobina F1 (100).

O gene da hemoglobina S é um gene de alta frequência em toda a América e no Brasil e é mais frequente nas regiões sudeste e nordeste. Na África Equatorial, 40% da população é portadora, e a doença falciforme atinge uma prevalência de 2 a 3% da população. De facto, estudos populacionais têm demonstrado a crescente presença de hemoglobina S em indivíduos de raça caucasiana (100).

As manifestações clínicas da Anemia Falciforme são as seguintes (100):

- I. Vaso-oclusão;
- II. Necrose avascular da medula óssea (crises álgicas/síndrome mão-pé/necrose da cabeça do fémur);
- III. Filtração esplénica alterada (aumento do risco de infeções por germes encapsulados). Fibrose esplénica progressiva. Osteomielite;
- IV. Síndrome torácica aguda;
- V. Vasculopatia cutânea (úlceras crónicas). Priapismo;
- VI. Retinopatias proliferativas. Acidente vascular encefálico;
- VII. Acometimento renal (tubulopatia/insuficiência renal crónica). Sequestro de glóbulos vermelhos (agudo ou crónico). Crescimento e desenvolvimento puberal atrasados. Hemólise;
- VIII. Anemia (Hb entre 6 e 9 g/100 ml). Hiperbilirrubinémia, icterícia e pigmento biliar. Expansão da medula óssea;
- IX. Crise.

As pesquisas realizadas em torno desta patologia da hemácia, ao longo de quase um século, a partir de 1910, cooperaram para a criação de um novo e importante segmento da ciência, denominada biologia molecular. A descoberta dos polimorfismos da mutação (GAT→GTG) no gene que codifica a cadeia β da hemoglobina, originando diferentes haplótipos da doença, permitiu um melhor e

mais amplo conhecimento em torno da heterogeneidade clínica nos doentes falcémicos (101).

Foi efetuado um estudo para investigar aspetos imunológicos e fenotípicos em indivíduos com anemia falciforme provenientes de Salvador, Bahia. O estudo foi desenvolvido em 126 doentes, sendo 103 em estado clínico estável da doença e 23 hospitalizados por vaso-oclusão e/ou infeção. Foram investigados os polimorfismos -251T>A e -308G>A, localizados respetivamente nos genes da IL-8 e do TNF α , por PCR e PCR-RFLP; os níveis séricos da IL-8 foram detetados por ELISA e a história clínica dos doentes foi obtida dos prontuários médicos. Os resultados mostraram a importância da interação dos marcadores de prognóstico na monitorização dos portadores com anemia falciforme e a participação da IL-8 no processo de vaso-oclusão. Estudos adicionais são necessários para estabelecer o papel dos níveis de IL-8 e de TNF α , bem como a presença de polimorfismos nesses genes, visando a sua utilização como marcadores de prognóstico no acompanhamento clínico desses indivíduos (102).

Há bastantes alterações imunológicas em doentes com anemia falciforme, englobando as causas da maior suscetibilidade às infeções e o papel das moléculas de adesão, citocinas e inflamação sobre a aderência anormal das hemácias falciformes ao endotélio vascular. A frequência de infeções por germes encapsulados é alta em doentes com anemia falciforme, principalmente pelo *Streptococcus pneumoniae* (103). Por isso há necessidade de profilaxia antibiótica e vacinação anti-pneumocócica. A melhor compreensão dos defeitos imunológicos que predispõem à inflamação e vasculite constantes, pode ser fundamental na escolha dos medicamentos que devem ser utilizados para diminuir as complicações vasculares da anemia falciforme.

Apesar dos progressos no conhecimento molecular da patologia nestes anos últimos, poucos recursos terapêuticos foram desenvolvidos. Correntemente o tratamento é feito com a hidroxiureia (104).

A hidroxiureia está indicada no tratamento da leucemia mielocítica crónica resistente e do melanoma. Em combinação com radioterapia também está indicada no tratamento de carcinomas da célula escamosa (epidermoide) primários da cabeça e pescoço (exceto do lábio) e carcinoma do cérvix. Além disso está indicada no controlo da drepanocitose no adulto para reduzir a frequência de crises vaso-oclusivas dolorosas e a hospitalizações associadas e a necessidade de transfusões sanguíneas. Os efeitos indesejáveis são a vários

níveis: hematológicos, gastrointestinais, dermatológicos, renais, neurológicos e outros. O mecanismo de ação deste medicamento na drepanocitose não é claro. Pode estar relacionado com um aumento da produção de hemoglobina F, diminuição dos neutrófilos, aumento do conteúdo em água dos eritrócitos, aumento da deformabilidade das células falciformes ou alteração da adesão dos eritrócitos ao endotélio. O mecanismo preciso dos seus efeitos citotóxicos e citoredutores não é conhecido. Foi sugerido que a hidroxiureia causa inibição imediata da síntese do ADN atuando como inibidor da redutase do ribonucleótido, sem interferir com a síntese do ácido ribonucleico ou da proteína. Nos doentes com drepanocitose tratados com hidroxiureia foram observados aumentos da hemoglobina fetal (Hb F) 4 a 12 semanas após o início do tratamento. De modo geral, os níveis de Hb F médios relacionam-se com a dose e o nível plasmático, com patamar possível para doses mais elevadas. Não foi demonstrada uma relação clara entre a redução na frequência das crises e aumentos nos níveis de Hb F ou células F. Os efeitos citotóxicos relacionados com a dose da hidroxiureia, particularmente nos neutrófilos, foi o fator mais fortemente relacionado com a redução da frequência das crises. Foram realizados estudos clínicos na Drepanocitose. A eficácia da hidroxiureia foi avaliada num estudo clínico de grandes dimensões. Este estudo foi um ensaio randomizado em dupla ocultação controlado por placebo que avaliou 299 doentes adultos (≥ 18 anos) com doença moderada a grave (≥ 3 crises dolorosas anuais). O tratamento com hidroxiureia ($n=152$) em comparação com o tratamento com placebo ($n=147$) resultou numa diminuição significativa da taxa anual de aparecimento de crises dolorosas (média 2.5 vs 4.6 episódios, $p=0.001$), da taxa anual de crises dolorosas que necessitam de hospitalização (média 1.0 vs 2.5 hospitalizações, $p=0.0027$), da incidência de síndrome anginoso (56 vs 79 doentes, $p=0.002$) e de unidades de sangue que foram dadas através de transfusão (423 vs 670 unidades, $p=0.003$) (105).

Relativamente ao uso de FT ainda não estão descritos estudos. No entanto podem-se utilizar para reforçar o sistema imunitário e desta forma diminuir a incidência de crises dolorosas, de infeções e aumentar a hemoglobina (106).

2.7. USOS FUTUROS DOS FATORES DE TRANSFERÊNCIA

Os FT podem vir a ser muito úteis tanto na terapêutica de várias patologias, em conjunto ou isoladamente, como na prevenção.

Nos anos 50 a penicilina foi uma descoberta revolucionária que salvou imensas vidas. Na altura, as infeções bacterianas eram facilmente debeladas. Mais tarde, as bactérias começaram a desenvolver resistências e os cientistas continuaram a desenvolver novos antibióticos. Na atualidade há bactérias que já desenvolveram resistências a vários antibióticos em todas as classes. O primeiro caso de resistência à vancomicina foi reportado nos EUA, Michigan, num doente de 40 anos, com diabetes e insuficiência renal crónica e portador de um enterococo resistente à vancomicina (107). Esta resistência foi sendo disseminada desde Inglaterra e França (1987) até EUA (1991) em que houve 38 hospitais que a detetaram. Em 1993 nos EUA 14% dos doentes com enterococos em unidades de cuidados intensivos já tinham desenvolvido resistência à vancomicina (1). Em Portugal um relatório da Direção Geral de Saúde já em 2010 alerta para o perigo de extinção dos antibióticos caso as bactérias continuem a resistir aos mesmos (108).

Em notícia do dia 14 de outubro de 2015 a morte de alguns doentes e o isolamento de outros, segundo a Coordenadora do Grupo Coordenador Local do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e Resistência aos Antimicrobianos do Centro Hospitalar Gaia/Espinho (CHVNG/E), Margarida Mota, em declarações à Lusa, é devida a uma bactéria presente na flora intestinal, que “desenvolveu ou recebeu um gene que lhe dá a capacidade de produzir uma enzima” resistente aos antibióticos (109). Continua as suas declarações dizendo “Torna-se preocupante quando passa para pessoas doentes, imunodeprimidas, com múltiplas comorbilidades. Dado que é resistente, tem uma alta taxa de mortalidade porque não temos sistemas de antibióticos adequados e eficazes para conseguir controlar a situação” (109). Este é um exemplo atual da resistência de bactérias aos antibióticos e da necessidade urgente de alternativas. Os FT são uma promessa no combate às infeções bacterianas incluindo a tuberculose, a pneumonia e outras, mesmo quando existe um longo tratamento de antibioterapia. Devido aos FT atuarem através do sistema imunitário e não combaterem diretamente os agentes patogénicos eles não podem substituir os antibióticos como tratamento de primeira linha para infeções bacterianas mas podem ser úteis em tratamento de suporte para reforçarem o sistema imunitário tornando-o mais inteligente no ataque contra os agentes patogénicos (1).

Os FT também poderão vir a ser usados de uma forma similar às vacinas protegendo das patologias antes de estar exposto às mesmas. Na verdade, o Dr Lawrence em 1940 também iniciou o uso dos FT desta forma. Pesquisadores na

China pensam que os FT poderão vir a ser úteis na prevenção e tratamento da hepatite B (110). Os FT podem colaborar na prevenção de infeções. O vírus do papiloma humano (VPH) é um vírus que pode ser transmitido sexualmente e pensa-se que pode ser o agente causador de muitos casos de cancro cervical (superior a 70%). O cancro cervical é curável se for detetado inicialmente e abrange cerca de 15000 mulheres/ano. A vacina para o VPH inclui três doses durante seis meses e é considerada segura. Também se podem utilizar os FT com esta finalidade (1).

Há várias vantagens no uso de FT. Uma delas é a velocidade de transferência da imunidade. A imunidade a um antigénio específico pode ser detetada poucas horas depois de administrados os FT (24 a 48 horas). É muito mais rápido que as vacinas (2 a 6 semanas). A produção de FT poderá ser realizada por síntese química ou por métodos recombinantes após identificação da sequência de aminoácidos presentes o que permitirá um grande desenvolvimento dos mesmos. O armazenamento também é fácil porque os FT são muito estáveis. Resumindo, embora ambos, vacinas e FT, se utilizem para provocar imunidade, os FT podem ser produzidos mais rapidamente, em largas quantidades, transportados sem cuidados especiais, administrados por via oral e têm pouquíssimos efeitos secundários. Apesar dos FT serem tão efetivos como as vacinas ainda não foi estudada a prevenção de uma doença numa larga comunidade por FT. Por isso o ideal deve ser administrar os dois para que haja melhor cobertura na prevenção de patologias provocadas por agentes infecciosos (1).

3.OBJETIVOS

3.1.PRINCIPAL

Divulgação da imunoterapia, com enfoque nos fatores de transferência, através da construção de uma base de dados de estudos clínicos.

3.2.ESPECÍFICOS

- I. Caracterizar o perfil do doente antes e pós intervenção clínica.
A caracterização deste perfil foi efetuado pelo Técnico de Saúde nas consultas de seguimento.
- II. Caracterizar a origem dos Fatores de Transferência usados no estudo.
Os FT utilizados no estudo foram obtidos através da ultra filtração do

colostro bovino e da gema do ovo. As moléculas obtidas através da ultra filtração do colostro bovino são de duas classes; os FT presentes são de tamanho inferior ou igual a 10000 Daltons e as moléculas da nanofração que estão presentes na nano filtração são de dimensão igual ou inferior a 3.500 Daltons (Anexo 1). A seleção deste suplemento de FT foi devido a várias razões: constituição de FT exclusivamente (não inclui fitoterapia), administração oral, comercialização (representação em Portugal).

III. Caracterizar medidas usadas para a avaliação de quadros clínicos.

Foram entregues a todos os Técnicos de Saúde Protocolos de Avaliação de Casos Clínicos.

4.METODOLOGIA

Este estudo teve como população alvo pessoas portadoras de patologias do foro imunitário, de todas as idades e sexo a nível internacional. Para o efetuar foram contactados Técnicos de Saúde de Portugal (Continente e Ilhas) e África (Angola e Guiné). Os Técnicos que aceitaram a realização do estudo trabalhavam em Lisboa, Braga e Angola (Huambo). Os estudos foram efetuados em Clínicas.

As patologias em estudo foram as seguintes: Dermatites, Doenças auto-imunes (Psoríase e Alopecia Areata), Infecções, Tendinites, Rinites, Asma, Drepanocitose entre outras.

Inicialmente havia a proposta de obtenção de cinquenta Casos Clínicos mas o estudo terminou com trinta e um Casos Clínicos.

Este estudo realizou-se entre Maio de 2015 e Maio de 2016. O seguimento de cada Caso Clínico foi efetuado durante um período de tempo variável (1 a 3 meses). Quase todos os Casos Clínicos tiveram a duração de três meses. No entanto a grande maioria dos Casos de Drepanocitose (8 Casos) foram seguidos durante um mês e obtiveram-se resultados positivos. O Caso Clínico de Drepanocitose que foi seguido durante três meses, obteve resultados muito positivos relativamente ao valor de Hemoglobina (HGB inicial- 5,1 e HGB final-9). A investigadora realizou alguns instrumentos de seguimento dos Casos Clínicos tais como: Caso Clínico Modelo (Anexo 2) em que os Técnicos inseriam os seguintes dados: idade, sexo, motivo da consulta, antecedentes pessoais, antecedentes familiares, história clínica que incluía os tratamentos efetuados e a evolução do quadro clínico com FT, conclusão. Foi entregue um questionário e Consentimento informado(Anexo 3) para entregar aos doentes para

preencherem antes de iniciar o estudo. Também foi entregue um Protocolo de Avaliação de Casos Clínicos (Anexo 4) a preencher pelo Técnico de Saúde.

A investigadora fez o seguimento dos Casos Clínicos com os Técnicos de Saúde e no final recolheu todos os dados mencionados anteriormente e exames no caso da sua existência. Todos os Casos de Drepanocitose foram acompanhados de análises ao sangue (antes e depois do tratamento) e a Infecção por E. Coli foi acompanhada por análises à urina (antes e depois do tratamento). Nos outros Casos em que não houve exames com suporte de papel, muitas vezes foram mencionados os resultados no relatório do Caso Clínico efetuado pelo Técnico de Saúde.

Seguidamente a investigadora desenvolveu uma Base de Dados em Access (2007/2010) e inseriu os dados obtidos dos Casos Clínicos. Esta inserção permitiu efetuar a organização e sistematização dos dados obtidos. Finalmente esta Base de Dados foi validada pelos Técnicos da área.

5. CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE ESTUDOS CLÍNICOS

5.1. INVESTIGAÇÃO DE BASE DE DADOS EXISTENTES E RESPECTIVA SELEÇÃO

As Bases de Dados (BD) surgiram para consubstanciar e eventualmente divulgar/ avançar futuramente com este trabalho. As bases de dados existem há anos mas até há pouco tempo o acesso a elas era demasiado complicado e caro. Atualmente simplificou-se bastante e com a chegada da era das auto-estradas da informação vai difundir-se muito mais. Estamos perante uma grande explosão devido ao uso da Internet (111).

Para tal, usam um sistema gestor de bases de dados (SGBD) que consiste numa coleção de dados inter-relacionados e um conjunto de programas para aceder a estes dados. A coleção de dados, normalmente denominada base de dados, contem informação relevante para uma entidade/organização. O objetivo principal de um SGBD é proporcionar uma forma de armazenar e recuperar a informação de uma base de dados de forma que seja tão prática como eficiente. Os sistemas de bases de dados desenham-se para gerir grandes quantidades de informação. A gestão dos dados implica tanto a definição de estruturas para armazenar a informação como a provisão de mecanismos para a manipulação da informação. Além disso, os sistemas de bases de dados devem proporcionar a fiabilidade da informação armazenada.

Quanto mais se conseguir armazenar e se souber sobre os dados, tanto melhor para qualquer tomada de decisão. Assim, ferramentas computacionais geradoras de novos conhecimentos são essenciais (112). Considerando-se a importância da indexação no processo de disseminação da informação na sociedade contemporânea, as bases de dados configuram-se como essenciais nesse processo. Como exemplo, a do *Institute for Scientific Information*, a mais abrangente base de dados de informações científicas do mundo (113).

Estas evoluíram para a Descoberta de Conhecimento em Bases de Dados e do *Data Mining* que se encontra em progressiva expansão. A todo o momento, surgem resultados e artigos de investigações em novos e diversos domínios (e.g., *MobiMine*, *Clinical Data Mining*, *BiblioMining*, *TextMining*, *WebMining*), novos modelos e técnicas, ferramentas e tecnologias, tornando a escolha e o desenvolvimento de projetos num problema difícil de contornar (114).

Havendo várias estruturas lógicas de BDs:

- I. BDs hierárquicas (os dados são distribuídos e localizados num nível superior em relação a outro conjunto de itens de dados)

- II. BDs em rede (estabelece-se por vínculos)
- III. BDs relacionais (as informações são mantidas em tabelas) (115)

optou-se por um modelo relacional por ser mais atual e por permitir uma melhor integração da informação.

De uma forma simplificada podemos dizer que uma base de dados corresponde a um conjunto de tabelas devidamente estruturadas. Uma tabela é um conjunto de linhas (ou registos) e colunas (ou campos) em que nas colunas estão os atributos sobre os quais pretendemos armazenar valores e as linhas são os valores que neles armazenamos. Por exemplo, no trabalho desenvolvido, na tabela de “Doentes”, estes foram identificados pelos campos “ID de doente”, “Nome”, “Contacto” e “Nº de BI”, gerando-se várias linhas correspondendo aos vários indivíduos estudados.

Todas as tabelas têm associada uma propriedade fundamental: uma forma única de identificar uma linha. Normalmente essa forma consiste em designar a qual dos seus atributos vai ser atribuída essa função de identificação (atributo chave). Para o exemplo já mencionado, podemos convencionar (ou impor) que não podem existir dois doentes com o mesmo número, ou seja, convencionar-se que o atributo ‘ID de Doente’ é a chave da tabela (não convém optar pelo atributo ‘Nome’ porque existem pessoas com o mesmo nome). Um atributo chave tem a particularidade de ser de preenchimento obrigatório.

E todas as tabelas ficaram devidamente estruturadas dado que é possível cruzar a informação considerada relevante (116).

5.2. DEFINIÇÃO E DESCRIÇÃO DOS ITENS DA BASE DE DADOS

A base de dados de sustentação aos estudos clínicos efetuados foi implementada no “Microsoft Access”, devido à sua facilidade de manuseamento, importação e exportação de dados, contendo vários itens:

Tabelas: para suportarem e armazenarem os dados

- I. Especialidades (ID.esp, Esp)
- II. Técnicos (ID_técn, ,Técn, Contacto, ID esp.)
- III. Doentes (ID_doente, Nome, DN, Morada, Contacto, NBI)
- IV. Observações (Data, ID doente, Obs. e Imagem, Melhoria)
- V. Exames (ID_exs, Nome)
- VI. Tratamentos (ID_trat, Tratamento, FT)

- VII. Obs_Trat – de relação entre observações feitas e tratamentos realizados, por doente
- VIII. Obs_Exs - de relação entre observações feitas e exames pedidos, por doente

Formulários: para permitirem inserir, alterar e remover os dados

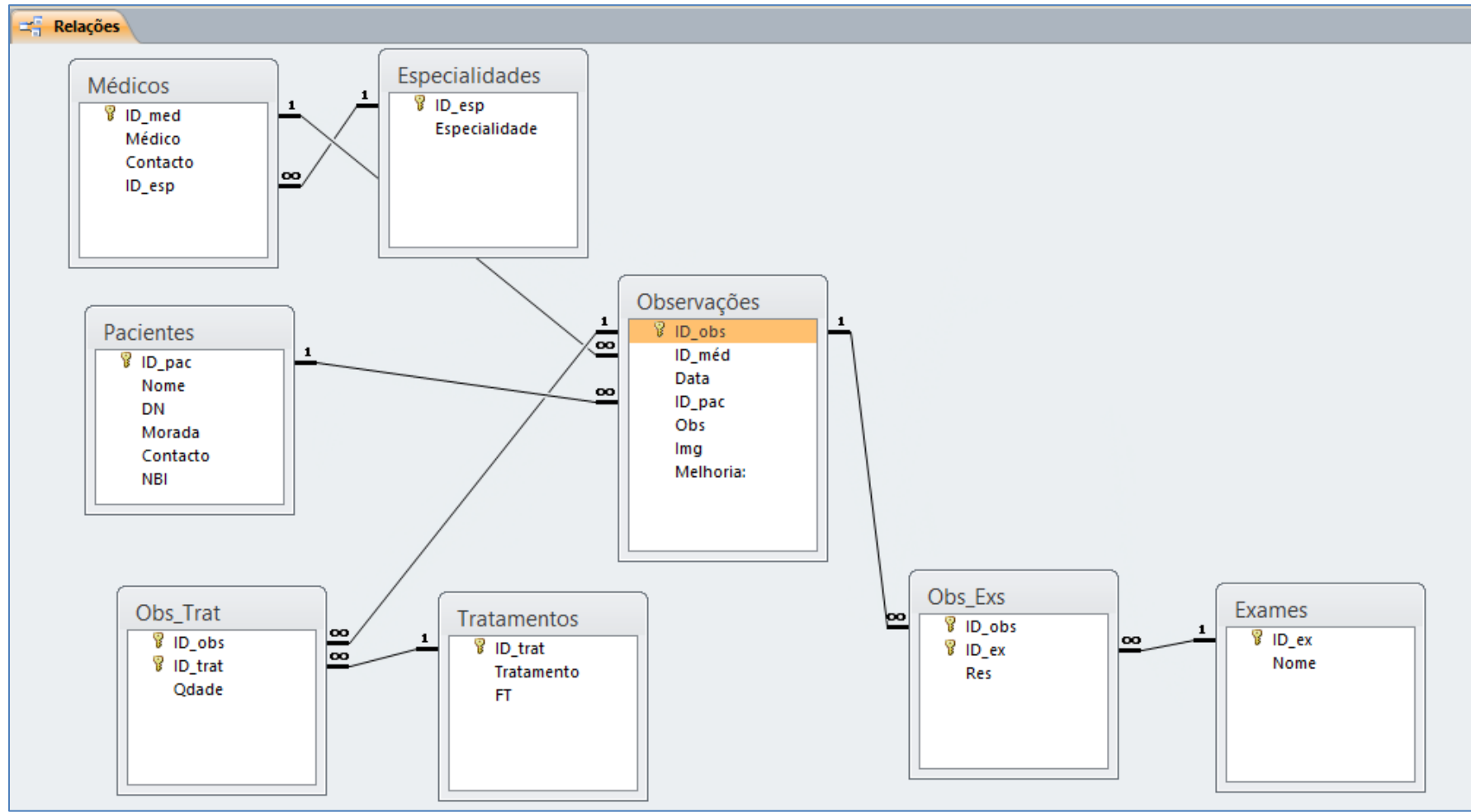
- I. Especialidades
- II. Especialidades e seus técnicos
- III. Exames
- IV. Exames pedidos/consulta
- V. Doentes
- VI. Registos
- VII. Tratamentos

Relatórios: para uma melhor visualização e impressão dos dados

- I. Especialidades
- II. Especialidades e seus técnicos
- III. Observações, especialidade e data
- IV. Doentes e melhorias
- V. Doentes femininos e masculinos
- VI. Doentes e seu historial
- VII. Doentes, seus exames e resultados totais de observações mensais de tratamentos com FT

Para um melhor entendimento da sua dinâmica, segue-se o Diagrama de Entidades e Relações a que está sujeita:

Diagrama de Entidades e Relações



5.3.CRIAÇÃO E VALIDAÇÃO DA BASE DE DADOS

Vários casos clínicos foram introduzidos, nomeadamente na área da Dermatologia, Pediatria, Alergologia, e Infeciologia entre outros.

Verificou-se que estava consistente e que mantinha e relacionava corretamente os dados, permitindo registar o desenrolar das situações de cada doente e inferir com pormenor, através dos resultados das observações diretas e exames realizados, sobre a eficácia dos produtos usados no tratamento, nomeadamente FT.

A fig. 10 relaciona as especialidades e os técnicos de Saúde que participaram ou ainda poderão participar, já que esta Base de Dados, foi criada não somente para este estudo mas também para outros estudos que se possam vir a realizar. As especialidades que participaram neste estudo foram as seguintes:

- I. Dermatologia
- II. Pediatria
- III. Anestesiologia
- IV. Enfermagem

Especialidades e seus técnicos		
Especialidade	Médico	Cód. Médico
OTL	Dr FS	9
	Dr MB	11
	Dra AC	2
Dermatologia	Dr ASB	1
	Dra HG	7
Psiquiatria	Dr FV	8
	Dra FB	3
Pediatria	Dr MB	4
	Dra GX	14
Cardiologia	Dr JMA	10
	Dra SM	5
Oncologia	Dr FM	6
Obstetria	Dra JP	21
Gastroenterologia	Dr ART	20
Alergologia	Dr JTM	24
Enfermagem	Enf MA	19
	Enf TA	22
	Enf VO	23
Anestesiologia	Dra FA	12

Fig. 10 – Exemplo de especialidades e técnicos associados.

Na fig. 11, os técnicos de saúde registaram as observações realizadas aos seus doentes.

Técnicos e suas observações					
Médico	Especialidade	Paciente	Data	Obs	
Dr ASB	Dermatologia	ARCRA ASB	07/05/2015	Xerose cutânea e crises de prurido evoluindo por crises. Eczematização nas pálpebras, região peri-oral, pregas dos cotovelos, face dorsal dos dedos das mãos e mamilos. Evolução irregular alternando períodos de agravamento e melhoria	
		ARCRA ASB	18/06/2015	Alguma melhoria tanto a nível cutâneo como respiratório.	
		ARCRA ASB	23/07/2015	Regressão total das lesões e melhoria da rinite alérgica.	
		ARCRA ASB	01/09/2015	Sem sintomatologia cutânea e respiratória.	

Dra GX	Pediatría	EF GX	16/12/2015	Drepanocitose. Infecções recorrentes.	
		EF GX	16/01/2016	Os parâmetros de HGB (hemoglobina) com um valor mais alto e de HCT (hematócrito). Além disso não tinha contraído infecções durante o tratamento com FT.	
		FB GX	10/11/2015	Diagnóstico de drepanocitose aos 15 meses com um internamento por celulite do membro superior esquerdo, sem antecedentes pre e pos natal. Valvulopatia reumática aos 6 anos. 3 irmãos dos quais 2 também possuem drepanocitose. Infecções clínicas bastante	
		FB GX	16/12/2015	Não referia qualquer queixa de infecção.	

Fig. 11 – Exemplo de técnicos e observações feitas.

Na fig. 12 relacionam-se as especialidades com as observações e data em que foram efetuadas.

Observações/especialidade e data						
Especialidade	Técnico	Data	Paciente	Obs	Melhoria:	
Anestesiologia	Dra FA	16/11/2015	UL DF	Abcesso cerebral há quatro anos. Foi submetida a cirurgia	<input type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/11/2015	NA DF	Tendinite já existente há algum tempo não respondendo	<input type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/11/2015	KA DF	Insuficiência Venosa dos membros.	<input type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/12/2015	KA DF	Melhoria parcial do rubor e do edema tendo posteriorme	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/12/2015	UL DF	Melhoria significativa sintomas.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/12/2015	NA DF	FT (600 mg/dia)- 2ºmês.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/01/2016	UL DF	Sem sintomas.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Anestesiologia	Dra FA	16/01/2016	NA DF	FT (600 mg/dia)- 3ºmês.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	RPPC ASB	Placas eritemato-descamativas médias e grandes nos coti	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	RASM ASB	Placas eritemato-descamativas infiltradas pouco prurigin	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	RAC ASB	Prurido e focos de eczematização dispersos pelo tronco e	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	JMPR ASB	Diversos focos extensos de alopecia areata na zona da ba	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	MABFC ASB	Psoríase em placas desde os cinco anos de idade que regr	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	RMTM ASB	Crises de urticária persistentes desde Dezembro de 2013.	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	SSMAO ASB	Prurido e eritema nas pálpebras, região naso-labial e mer	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	MCCBP ASB	Dermite atópica desde lactente, alternando períodos de r	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	LPG ASB	Crises de eczematização recorrente em diversas partes di	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	07/05/2015	ARCRA ASB	Xerose cutânea e crises de prurido evoluindo por crises.	<input type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	18/06/2015	RPPC ASB	Ligeira melhoria a nível da descamação.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Dermatologia	Dr ASB	18/06/2015	LPG ASB	Alguma melhoria do quadro clínico cutâneo e respiratóric	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	12/11/2015	FAF MA	Dermatite atópica.	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	12/11/2015	LR MA	Aos 9 meses teve um surto de falta de ar seguida de bron	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	13/11/2015	FA MA	Rinite alérgica	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	13/11/2015	CS MA	Período mais complicado da Bronquite asmática: infância	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	13/11/2015	NA MA	Osteoporose e Osteoartrose que se desenvolveram imed	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	13/11/2015	MC MA	Rinite alérgica.	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	13/11/2015	MR MA	Amigdalites recorrentes principalmente no Inverno.	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	12/12/2015	JM MA	Fibrose cística e sinusite.	<input type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	14/12/2015	CS MA	Tinha muito mais energia e já não referiu a sintomatologi	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	15/12/2015	LR MA	A sintomatologia foi aliviando de forma a evitar o uso de	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	15/12/2015	FAF MA	Melhoria do quadro clínico de rinite alérgica e de dermati	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	16/12/2015	FA MA	Já estava assintomático.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	16/12/2015	NA MA	Estável não tendo tido mais episódios de crise apesar de	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	16/12/2015	MR MA	Tem estado sem ocorrências.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	16/12/2015	MC MA	Bastantes melhorias tendo-se suspenso os antihistamí	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	NA MA	Teve o surgimento de outra gripe, mas sem infecção resp	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	MR MA	Tem estado sem ocorrências.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	MC MA	Estável.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	FA MA	Permaneceu assintomático.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	FAF MA	Melhoria do quadro clínico de rinite alérgica e de dermati	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	CS MA	A doente continua assintomática mesmo sem fazer a tom	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	06/01/2016	LR MA	Assintomático.	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	15/01/2016	JM MA	bastantes melhorias tendo diminuído a rinorreia e as cef	<input checked="" type="checkbox"/>	
Enfermagem	Enf MA	04/02/2016	FAF MA	Melhoria do quadro clínico de rinite alérgica e de dermati	<input checked="" type="checkbox"/>	

Fig. 12 – Exemplo de observações por data e especialidade.

Na fig. 13 são registadas as melhorias de doentes (neste caso, com Drepanocitose) e tratados ou não com FT.

Doentes e melhorias						
Nome	Sexo	Dat. Nasc.	Médico	Obs	Melhoria:	Tratamento
XA GX	M	20/01/2011	Dra GX	Pré-natal e natal sem relevância. Dactilite aos 6 meses de idade e nessa altura foi feito o diagnóstico de Drepanocitose. Hemotransfusão aos 2 anos. Internamento hospitalar devido a 2 broncopneumonias. Discreta palidez das mucosas. Hepatomegalia de 2cm não dolorosas em sinais de hepatopatia. Infeções recorrentes. Drepanocitose.	<input type="checkbox"/>	4 Life Transfer Factor® Tr
						Ácido fólico
						Fenoxi-metilpenicilina
XA GX	M	20/01/2011	Dra GX	Algumas melhorias	<input checked="" type="checkbox"/>	4 Life Transfer Factor® Tr
UA GX	M	30/01/2014	Dra GX	Pre-natal e natal sem relevância. Diagnosticado com 1 ano de idade de drepanocitose quando fez a primeira hemotransfusão. Três hemotransfusões feitas. Atualmente esplenomegalia do grau 2 e sub-icterícia. Discreta palidez das mucosas. Hepatomegalia de 2cm não dolorosas em sinais de hepatopatia. Infeções recorrentes.	<input type="checkbox"/>	4 Life Transfer Factor® Tr
						Ácido fólico
						Penicilina benzatínica

Fig. 13 – Exemplo de observações em doentes que mostraram melhorias dos sintomas.

Na fig. 14, é relacionado o doente com a sua história clínica na especialidade (no exemplo, de dermatologia).

Doentes e seu historial										
Nome	DN	Contacto	Médico	Especialidade	Consulta	Obs	Melh	Exames	Resultado	Tratamento
MCCBBP ASB	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	Rast	CI IV ácaros	Ciclosporina
	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	Rast	CI IV ácaros	4LifeTransfer Factor® Tri-
	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	IgE	>2000	Emoliente corporal
	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	IgE	>2000	Ciclosporina
	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	IgE	>2000	4LifeTransfer Factor® Tri-
	09/10/2001		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Alguma melhoria no quadro clínico.	☑	Rast	CI IV ácaros	Emoliente corporal
RAC ASB	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia ácaros	Classe III	Prednisolona
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Eosinofilia	6,1%	Aceponato de metilpredn
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Eosinofilia	6,1%	Prednisolona
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	TASO	436	4LifeTransfer Factor® Tri-
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	TASO	436	Aceponato de metilpredn
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	TASO	436	Prednisolona
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia gramíneas	Classe II	4LifeTransfer Factor® Tri-
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia gramíneas	Classe II	Aceponato de metilpredn
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia gramíneas	Classe II	Prednisolona
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Eosinofilia	6,1%	4LifeTransfer Factor® Tri-
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia ácaros	Classe III	Aceponato de metilpredn
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Phadiatop	15,3	4LifeTransfer Factor® Tri-
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Phadiatop	15,3	Aceponato de metilpredn
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Phadiatop	15,3	Prednisolona
	13/03/1996		Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015	Registou melhorias a nível do quadro dermatológico	☑	Alergia ácaros	Classe III	4LifeTransfer Factor® Tri-

Fig. 14 – Exemplo de historiais clínicos

Na fig.15, estão relacionados os doentes da especialidade de dermatologia e pediatria com os seus exames e resultados.

Doentes e seus exames								
Nome	Sexo	Dt. Nasc	Contacto	Técnico Saúde	Especialidade	Data Obs.	Exames	Resultado
EF GX	M	18/06/2014	Dra GX		Pediatria	16/12/2015	HCT	23,4%
							HGB	6,8
EF GX	M	18/06/2014	Dra GX		Pediatria	16/01/2016	HCT	26,2%
							HGB	7,7
LS GX	F	10/01/2009	Dra GX		Pediatria	10/11/2015	HCT	22%
							HGB	6,8
LS GX	F	10/01/2009	Dra GX		Pediatria	16/12/2015	HCT	25%
							HGB	7,5
MCCBBP ASB	F	09/10/2001	Dr ASB		Dermatologia	18/06/2015	IgE	>2000
							Rast	Cl IV ácaros+gram.
NU GX	F	18/06/2012	Dra GX		Pediatria	10/02/2016	HCT	
							HGB	5,1
NU GX	F	18/06/2012	Dra GX		Pediatria	21/02/2016	HCT	0
							HGB	7,6
NU GX	F	18/06/2012	Dra GX		Pediatria	11/05/2016	HCT	
							HGB	9
RAC ASB	M	13/03/1996	Dr ASB		Dermatologia	18/06/2015	Alergia ácaros	Classe III
							Alergia gramíneas	Classe II
							Eosinofilia	6,1%
							Phadiatop	15,3
TH GX	M	10/02/2014	Dra GX		Pediatria	16/12/2015	TASO	436
							HCT	20%
							HGB	6
TH GX	M	10/02/2014	Dra GX		Pediatria	16/01/2016	HCT	23%
							HGB	6,9

Fig. 15 – Exemplo de exames pedidos e respetivos resultados.

Na fig.16, registam-se as observações mensais dos doentes na especialidade (como por exemplo, de dermatologia).

Totais de Observações Mensais				
Nome				
Mês	maio 2015			
Médico	Dr ASB			
	Data	Especialidade	Doente	Obs
	07/05/2015	Dermatologia	RAC ASB	Prurido e focos de eczematização dispersos pelo tronco e membros. Evolução irreg
	07/05/2015	Dermatologia	MCCBBP ASB	Dermite atópica desde lactente, alternando períodos de remissão e agravamento.
	07/05/2015	Dermatologia	RPPC ASB	Placas eritemato-descamativas médias e grandes nos cotovelos, antebraços, dorso
	07/05/2015	Dermatologia	RASM ASB	Placas eritemato-descamativas infiltradas pouco pruriginosas localizadas na região
	07/05/2015	Dermatologia	RMTM ASB	Crises de urticária persistentes desde Dezembro de 2013.
	07/05/2015	Dermatologia	MABFC ASB	Psoríase em placas desde os cinco anos de idade que regrediu parcialmente ao ini
	07/05/2015	Dermatologia	SSMAO ASB	Prurido e eritema nas pálpebras, região naso-labial e mento após aplicação de imp
	07/05/2015	Dermatologia	ARCRA ASB	Xerose cutânea e crises de prurido evoluindo por crises.
	07/05/2015	Dermatologia	JMPR ASB	Diversos focos extensos de alopecia areata na zona da barba com cerca de ano e m
	07/05/2015	Dermatologia	LPG ASB	Crises de eczematização recente em diversas partes do corpo, em especial nas fl
Total:	10			
Total mensal:	10			
Mês	junho 2015			
Médico	Dr ASB			
	Data	Especialidade	Doente	Obs
	18/06/2015	Dermatologia	RMTM ASB	Não se observaram melhorias.
	18/06/2015	Dermatologia	SSMAO ASB	Melhorias a nível dermatológico.
	18/06/2015	Dermatologia	RPPC ASB	Ligeira melhoria a nível da descamação.
	18/06/2015	Dermatologia	RASM ASB	Não registou qualquer melhoria.

Fig. 16 – Exemplo de resultados mensais.

Na fig. 17 relacionam-se os tratamentos efetuados com os Técnicos de Saúde, especialidades e datas.

Tratamentos com FT					
Doente	4Life Transfer Factor® Tri-Factor®	Contato	Médico	Especialidade	Data
ARCRA ASB			Dr ASB	Dermatologia	07/05/2015
ARCRA ASB			Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015
ARCRA ASB			Dr ASB	Dermatologia	23/07/2015
CS MA			Enf MA	Enfermagem	13/11/2015
CS MA			Enf MA	Enfermagem	14/12/2015
EF GX			Dra GX	Pediatria	16/12/2015
FA MA			Enf MA	Enfermagem	13/11/2015
FA MA			Enf MA	Enfermagem	16/12/2015
FAF MA			Enf MA	Enfermagem	12/11/2015
FAF MA			Enf MA	Enfermagem	15/12/2015
FAF MA			Enf MA	Enfermagem	06/01/2016
FB GX			Dra GX	Pediatria	10/11/2015
JM MA			Enf MA	Enfermagem	12/12/2015
JM MA			Enf MA	Enfermagem	15/01/2016
JMPR ASB			Dr ASB	Dermatologia	07/05/2015
JMPR ASB			Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015
JMPR ASB			Dr ASB	Dermatologia	23/07/2015
KA DF			Dra FA	Alergologia	16/11/2015
LC GX			Dra GX	Pediatria	10/11/2015
LPG ASB			Dr ASB	Dermatologia	07/05/2015
LPG ASB			Dr ASB	Dermatologia	18/06/2015
LPG ASB			Dr ASB	Dermatologia	23/07/2015
LR MA			Enf MA	Enfermagem	12/11/2015

Fig. 17 – Exemplo de doentes tratados com FT.

Na fig. 18 os doentes inseridos no estudo estão distribuídos por sexo, sendo 17 do sexo masculino e 14 do sexo feminino, o que perfaz 31 doentes.

Doentes Femininos e Masculinos					
Sexo	F				
Nome	Dt. Nasc.	Morada	Contacto	BI	
ARCRA ASB	10/05/1991	Braga			
CS MA	10/01/1991	Lisboa			
EP MA	12/03/1981	Lisboa			
FAF MA	05/03/2013	Lisboa			
FB GX	01/03/2008	Huambo-Angola			
KA DF	11/02/1952	Lisboa			
LC GX	08/01/2008	Huambo-Angola			
LPG ASB	21/03/2001	Braga			
LS GX	10/01/2009	Huambo-Angola			
MABFC ASB	29/07/1976	Braga			
MCCBBP ASB	09/10/2001	Braga			
MR MA	01/02/2004	Lisboa			
NA MA	02/02/1962	Lisboa			
NU GX	18/06/2012	Huambo-Angola			
SSMAO ASB	09/07/1973	Braga			
UL DF	10/02/1970	Lisboa	(91) 123 45		
VL GX	02/02/2000	Huambo-Angola			
17	Subtotal				

Sexo	M				
Nome	Dt. Nasc.	Morada	Contacto	BI	
EF GX	18/06/2014	Huambo-Angola			
FA MA	05/01/2011	Lisboa			
JM MA	08/02/1961	Lisboa			
JMPR ASB	20/06/1973	Braga			
LR MA	30/03/2010	Lisboa			
MC MA	10/04/1948	Lisboa			
NA DF	09/02/1962	Lisboa			
RAC ASB	13/03/1996	Braga			
RASM ASB	26/06/1988	Braga			
RMTM ASB	03/09/1977	Braga			
RPPC ASB	15/08/1982	Braga			
TH GX	10/02/2014	Huambo-Angola			
UA GX	30/01/2014	Huambo-Angola			
XA GX	20/01/2011	Huambo-Angola			
14	Subtotal				
31	Total				

30 de maio de 2016

Página 1 de 1

Fig. 18 – Exemplo de doentes, distribuídos por sexo.

5.4.PROMOÇÃO E DIVULGAÇÃO DA MESMA

A promoção desta base de dados será feita junto dos cientistas, do pessoal de saúde e do público em geral para divulgar o conhecimento dos FT. Esta promoção será feita através da publicação do trabalho em revistas e a partir de um *website* criado para o efeito (<https://sites.google.com/site/fatoresdetransferencia2016/>).

Estas ações de divulgação têm como finalidade aumentar o alcance da divulgação da Base de Dados de Casos Clínicos de Fatores de Transferência, permitindo desta forma uma melhor decisão de terapêutica pelo pessoal de saúde.

A BD com os Casos Clínicos obtidos estará disponível através do *site*, podendo qualquer pessoa aceder aos dados e eventualmente continuar o estudo. Quando acabar esse trabalho, poderá enviar os seus dados através de contacto para o efeito, para que a BD possa evoluir.

Relativamente aos Casos Clínicos estudados, retiram-se as seguintes conclusões:

- I. FT são importantes imunomoduladores ;
- II. Em 80.6% dos Casos Clínicos registaram-se melhorias;
- III. Nos Casos Clínicos de Dermatologia registaram-se melhorias clínicas nas Dermatites e algumas vezes nos quadros respiratórios associados;
- IV. Nos Casos Clínicos de Alergologia, nomeadamente Rinites, Sinusites e Asma os doentes tiveram melhorias clínicas;
- V. Nos Casos Clínicos de Drepanocitose os doentes registaram melhorias do quadro clínico, não tendo registado durante o tratamento, qualquer infeção ou outra sintomatologia e registaram melhorias da Anemia comprovadas com exames laboratoriais;
- VI. No Caso Clínico de Infeção Urinária causada por E. Coli resistente à antibioterapia indicada como sensível (com um ano de duração), a doente nunca mais teve sintomas e a urocultura foi negativa;
- VII. No Caso Clínico de Tendinite na mão direita com incapacidade funcional, não respondendo a analgésicos e anti- inflamatórios não esteróides, no final de dois meses de tratamento registou-se o desaparecimento de toda a sintomatologia;

- VIII. No Caso Clínico de Diarreia sem causa conhecida, sem melhoria com a terapêutica efetuada anteriormente, no final de dois meses de tratamento a sintomatologia desapareceu quase na totalidade;
- IX. Nos Casos Clínicos de Dermatologia em que não se registaram melhorias, e após análises dos mesmos, talvez a duração (ex: Psoríase), dose (ex: Psoríase) e *compliance* (ex: Alopecia areata) não tenha sido a mais correta;
- X. Nitidamente, os FT são relevantes na melhoria ou prevenção de patologias como Dermite, Infecções, Sinusite, Rinite, Asma e Drepanocitose em qualquer idade e sexo, tanto como adjuvante da terapêutica como isoladamente dependendo da patologia e do seu grau;

Dificuldades encontradas neste trabalho:

- I. Desconhecimento dos FT pelo público em geral;
- II. Contactos realizados com algumas empresas que comercializam FT sem ter obtido resposta;
- III. Morosidade do Processo: contactos com médicos, início dos Casos Clínicos, *Compliance* dos doentes e recolha de dados;
- IV. Alcance dos objetivos iniciais de recolha de cinquenta Casos Clínicos;

As conclusões deste estudo são as seguintes:

- I. A Base de Dados apesar do número de Casos Clínicos ser menor do que o objetivo inicial, provou estar adequada e suficientemente válida;
- II. Importância dos FT no Sistema Imunitário e consequentemente na prevenção e como adjuvantes de terapêutica, no caso de patologias em que o sistema imunitário precise de ser melhorado.

Através deste trabalho foi elaborada uma revisão bibliográfica dos FT.

Os casos clínicos desenvolvidos em especialidades diversas, permitiram demonstrar a segurança e eficácia destes imunomoduladores, durante o período utilizado de 30-90 dias. Os resultados confirmaram estudos efetuados anteriormente exceto na área da Drepanocitose. Nesta última é fundamental a prevenção com FT, dado que a patologia é grave e geralmente só se estabelece terapêutica na crise.

Em todas as especialidades estudadas o uso de FT é importante na prevenção e como adjuvante da terapêutica.

A Imunoterapia é um dos avanços mais importantes do nosso século já que os fármacos em variadíssimas áreas desde o Cancro à Infeciologia, entre outras, se revelaram insuficientes.

A Base de Dados foi assaz importante para organizar e sistematizar o conhecimento adquirido com os Casos Clínicos desenvolvidos. Esta Base de Dados provou estar adequada e suficientemente válida.

BIBLIOGRAFIA

1. **Aaron White, PhD.** *A Guide to Transfer Factors & Immune System Health*. 2nd Edition. 2009.
2. **Roitt, Brostoff and Male.** *Immunology*. fourth edition. 1996.
3. *Informe sobre el Factor de Transferencia*. **Hennen, William J, Ph.D.** Salt Lake City -UTAH- EUA : Woodland Publishing, 1998.
4. **Benneth Ph.D., Richard H.,** *Scientific Evidence Documents the Immune Functions of Transfer Factors: Education, Enhancement and Modulation*, Apllied Life Sciences LLC.
5. **William, Hennen J, Ph.D.** *“Informe sobre el Factor de Transferencia”*.
6. *Factores de transferencia en la terapéutica médica*. **Sanchez Gonzalez, Dolores J., Sosa Luna, Carlos A. and Moctezuma, Ismael Vásquez.** México : Elsevier Espana, 2010, Vols. 137(6): 273-277.
7. **Wilson, Gregory B. and Fudenberg, Herman. H.** *Use of In Vitro Assay Techniques to Measure Parameters Related to Clinical Applications of Transfer Factor Therapy*. 4610878 EUA, Setembro 09, 1986.
8. **Lehninger, Albert L.** *Bioquímica Las bases moleculares de la estrutura y función celular* . Barcelona : Ediciones Omega, S.A., 1978.
9. **Immunology, Immunopathology and Immunity.** Sell S. Appleton and Lange: Stamford CT 1996.
10. *Progress in drug Research*. **Fudenberg, H. and G. Pizza.** 1994, Vols. 42, 309-400, pp. 42: p. 309-400.
11. *Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences*. **Kirkpatrick, Charles H.** s.l. : Molecular Medicine, 2000, Vols. 6(4): 332-341, pp. 6(4): p. 332-41.
12. **Fudenberg, Hugh H and Pizza, Giancarlo.** *Transfer Factor 1993: New Frontiers. Progress in Drug Research*. 1994, Vol. 42.
13. **Kirkpatrick, Charles H.** *Activities and characteristics of transfer factors - Biotherapy*. 1996. pp. 9: 13-16.
14. **Dwyer, John M.** *Transfer Factor in the age of molecular biology: A review. Biotherapy*. 1996, pp. 9: 7-11.
15. **Krishnaveni, Marimuthu.** *A review on Transfer Factor an immune modulator. Drug invention today* . 5(2013). pp. 153-156.
16. **Wilson, Gregory B. and Paddock, Gary V.** *U.P. Office* . USA : Amtron, Inc, 1989.
17. —. *Process for obtaining transfer factor from colostrum transfer factor so obtained and use thereof*. Patent Number US4816563 Patent Date 1989-03-28.2.

18. **Lawrence, H.S.,** *J Clin Invest*, 1995. #4(2):p.516-22.
19. **Thomas, Heather Smith.** TRANSFER FACTOR-a better way to prevent disease. <http://ramaekersnutrition.com/>. [Online] 05 2015. http://ramaekersnutrition.com/wp-content/uploads/2015/05/TRANSFER_FACTOR-Cowman.pdf.
20. Jarisch-Herxheimer reaction. *Wikipedia*. [Online] Wikimedia Foundation, Fevereiro 23, 2016. [Cited: Março 31, 2016.] https://en.wikipedia.org/wiki/Jarisch%E2%80%93Herxheimer_reaction.
21. **Wu, S. and Zhong, X.** *Observation of the effect of PSTF oral liquor on the positive tuberculin test reaction. ChungKuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao.* . 1992. pp. 14:314-316.
22. *In vitro studies during long term oral administration of specific transfer factor.* **Pizza, G., et al., et al.** 1996, *Biotherapy*, pp. 9:175-185.
23. *Oral transfer factor use in the hyper IgE syndrome.* **Jones, JF., Jeter, WS. and Hicks, MJ.** New York : Academic Press, 1983, *Immunobiology of Transfer Factor*, pp. 61-70.
24. *Type 1A diabetes mellitus-associated autoimmunity.* **Liu, E. and Eisenbarth, GS.** 2002, *Endocrinol Metab Clin North Am*, pp. 31:391-410.
25. **Lisombee David A, Calvin McCausland, Richard Bennett, Brent Vaughan, Shane Lefler.** *Nanofraction immune modulators, preparations and compositions including the same, and associated methods.* US20080081076 EUA, Abril 3, 2008. Candidatura.
26. *Chronic mucocutaneous moniliasis with impaired delayed hypersensitivity.* **Kirkpatrick CH, Chandler, J W and Schimke, R N.** s.l. : *Cinical Exp Immunol*, 1970, Vols. 6:375-385.
27. **Hennen, William J.** *Enhanced Transfer Factor.* Salt Lake City-UTAH- EUA : Woodland Publishing, 1999.
28. *Scientific Evidence Documents the Immune Functions of Transfer Factors: Education, Enhancement and Modulation.* **Benett, Richard H.** s.l. : *Applied Life Sciences*.
29. *Transfer Factor a Better Way to Prevent Disease.* [Online] [Cited: Abril 21, 2016.] http://ramaekersnutrition.com/wp-content/uploads/2015/05/TRANSFER_FACTOR-Cowman.pdf.
30. *Transfer Factors Nature's State-of-the-Art Immune Fortifiers.* **Elkins, Rita M. H.** *Fatores de Transferência*, EUA : Woodland Publishing, 2001.
31. **Hennen, William J.** *El Factor de Transferencia fortalecido. La combinacion de un extraordinario suplemento para una funcion Imune optima.* *Web site de In Slideshare.* [Online] Janeiro 24, 2013. [Cited: Abril 9 , 2016.] pt.slideshare.net/licrishard/1986/libro-del-dr-william-hennen.
32. **Ministerio de Salud y Desarrollo Social de la Federación Rusa.** *Uso de los Factores de Transferencia en la Rehabilitación Inmunológica después de Enfermedades Infecto-Inflamatorias y Enfermedades Somáticas Moscú.* 2004.

33. *Transfer Factor and Allergy*. **Gómez, Vera J., et al., et al.** Nov-Dec 2010, Rev Alerg Mex, pp. 6:208-214.
34. *New concepts about atopic dermatitis*. **Sosa, Vasquez M., Orea, M. and Flores, G.** Jan-Feb 2001, Revista Alergia Mexico, pp. 1:15-24.
35. **Leung, DYM and Soter, NA.** *Cellular Immunologic mechanisms in atopic dermatitis*. s.l. : JAAD, 2001.
36. *Quality of life in children and teenagers with atopic dermatitis*. **Amaral, CSF, Sant'Anna, CC and March, MFBP.** 2012, AnBrasDermatol, pp. 87(5):717-23.
37. *Dermatite Atópica*. **Simao, L. and Miguel, H.** s.l. : Sociedade Brasileira de Pediatria, 2014.
38. **Cabral, Rafaela Dias.** *Dermatite Atópica - Revisão da Literatura*. Alfenas : Instituto de Ciências da Saúde- Faculdades Unidas do Norte de Minas -Funorte, 2013. *Dermatite Atópica*.
39. *Safety and efficacy of treatment for severe atopic dermatitis with cyclosporin A and transfer factor*. **Cordero, Miranda MA., et al., et al.** 1999, Revista Alergia Mexico, pp. 46(2):49-57.
40. *Inflammatory mediators in patients with atopic dermatitis after treatment with transfer factor*. **Orozco, TT., et al., et al.** 2004, Revista Alergia Mexico, pp. 51(4): 151-154.
41. *Transfer factor as specific immunomodulator in the treatment of moderate-severe atopic dermatitis*. **Flores, Sandoval G., et al., et al.** 2005, Revista Alergia Mexico, pp. 52(6): 215-220.
42. *Transference factor in moderate and severe atopic dermatitis*. **Navarro, Cruz D., et al., et al.** Sep-Oct 1996, Revista Alergia Mexico, pp. 43(5):116-123.
43. *El efecto terapêutico del factor de transferência en el tratamiento de pacientes com dermatitis atópica grave*. **Rodriguez, A., et al., et al.** Jan-Abril 2002, Alergia, Asma e Imunologia Pediátricas, pp. 48(1):9-11.
44. *Comparative treatment between thalidomide and transfer factor in severe atopic dermatitis*. **Sosa, M., et al., et al.** 2001, Revista Alergia Mexico, pp. 48(2): 56-64.
45. *Asma:uma revisão de literatura*. **Augnes, Ruth Moise, et al., et al.** Florianópolis : Revista Saúde Pública Santa Cat. Florianópolis, 2012, Vol. 5.
46. **Quiroga, Ramiro C. and Parra, Sergio E.** *El factor de transferencia como inmunomodulador en el asma bronquial extrínseca II, estudo de 150 casos*. Facinmune Productos Biológicos Para Exportación S.A. de C.V.
47. **Filho, Pierre d'Almeida Telles .** *Asma Bronquica. Informações Médicas*. [Online] 01 28, 2016. [Cited: 04 15, 2016.]
http://www.asmabronquica.com.br/medical/tipos_de_asma_classifica.html.

48. *Efecto del factor de transferencia en el tratamiento con glucocorticóides en un grupo de pacientes pediátricos com asma alérgica moderada persistente.* **Padilla, Sara E., et al., et al.** May-Jun 2009, *Revista Alergia Mexico*, pp. 56(3): 67-71.
49. *The usefulness of transfer factor in asthma associated with frequent infections.* **A, Khan, et al., et al.** s.l. : *Annals of Allergy*, 1978, Vols. 40(4):229-32.
50. *Diseases of the Skin: clinical Dermatology.* **James, William D., Berger, Timothy G. and al., et.** s.l. : [S.l.]: Saunders Elsevier, 2006.
51. **Coelho, Manuel Pinto.** *Chegar Novo a Velho - Medicina do Futuro.* s.l. : Prime Books, 2015.
52. Artrite Reumatoide. [Online] 2013. [Cited: Abril 10, 2016.] <http://www.spreumatologia.pt/doencas/artrite-reumatoide>.
53. **Spanevello, Roselia Maria.** *Avaliação de atividade de nucleotidases e parâmetros de estress oxidativo em pacientes com esclerose múltipla e em modelo experimental de desmielinização em ratos.* Porto Alegre, RS, Brasil : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
54. *Transfer Factor as a therapy for multiple sclerosis: a follow-up study.* **Frith, JA., et al., et al.** 1986, *Clinical and Experimental Neurology*, pp. (22):149-154.
55. *Ezrin, maspin, peroxiredoxin 2, and Hsp27: Potential targets of a streptococcal-induced autoimmune response in psoriasis.* **Besgen, P., et al., et al.** 2010, *J Immunol.*, pp. (184):5392-40229.
56. *Epidemiology of psoriasis.* **Naldi, L.** 2004, *Curr Drug Targets Inflamm Alergy*, pp. 3(2):121-128.
57. *Cutaneous side- effects in patients with rheumatic diseases during application of tumour necrosis factor-alpha antagonists.* **Lee, HH., Song, IH., Friedrich, M., et al., et al.** Mar 2007, *Br J dermatol*, pp. 156(3):486-491.
58. *Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis.* **Krueger, JG. and Bowcock, A.** 2005, *Ann Rheumatic Dis*, pp. (64):30-36.
59. *Innate and adaptive immunity and the pathophysiology of psoriasis.* **Gaspari, AA.** 2006, *J AM Acad Dermatology*, pp. 54(3):67-80.
60. *Psoriasis and the metabolic syndrome.* **Gottlieb, AB., Dann, F. and Menter, A.** 2008, *J. Drugs Dermatol*, pp. 7(6):563-572.
61. *Atherosclerosis is an inflammatory disease.* **Ross, R.** Nov 1999, *Am Heart J*, pp. 138(5 Pt):S4:19-20.
62. **Associação Portuguesa de Psoríase.** PSO Portugal. [Online] <http://www.psoportugal.pt>.
63. *Circulating Th17, Th22, and Th1 cells are increased in psoriasis.* **Kagami, S., et al., et al.** May 2010, *J Invest Dermatol*, pp. 130(5):1373-1383.

64. **Hennen, William J.** *Fibromyalgia a comprehensive approach*.
65. *Actividade da Doença de Crohn e crescimento*. **Tavares, L., et al., et al.** Lisboa : s.n., Jan 2013, *Jornal Português de Gastreenterologia* , Vol. 20.
66. **Van, DSJ.** *Immunotherapy of Chron's Disease*.
67. *Terapêutica Farmacológica na Doença de Crohn*. **Portela, F.** Lisboa : s.n., Mar 2009, J Sociedade Portuguesa de Gastroenterologia, Vol. 16. 2.
68. *Efeitos de Imunomoduladores na Doença de Crohn*. **Carvalho, A. and Carvalho, M.** Jul-Set 2013, *Jornal Português de Gastreenterologia*, Vol. 6, pp. 71-79. 3.
69. *Cell mediated immunity and transfer factor in Crohn's disease*. **Ng, RP. and Vicary, FR.** Jul 1976, *Br Med J*, pp. 2(6027):87-88.
70. *Use of transfer factor for the treatment of recurrent non-bacterial female cystitis(NBRC): A preliminary report*. **Vinci, C., et al., et al.** 1996, *Biotherapy*, pp. (9):133-138.
71. *Transfer Factor :an overlooked Potential for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases*. **Viza, D., et al., et al.** 2013, *Folia Biologica(Praha)*, pp. (59):53-67.
72. *Câncer*. *Wikipédia*. [Online] Wikimedia project, Abril 17, 2016. [Cited: Abril 18, 2016.] <https://pt.wikipedia.org/wiki/C%C3%A2ncer>.
73. *Discovery D Salud* . **Muro, Antonio F.** Vol. 76.
74. *In vitro effects of bovine dialyzable leukocyte extract in cancer cells*. **Franco, Molina MA, et al., et al.** Mexico : *Cytotherapy*, 2006, Vols. 8(4): 408-14.
75. *Interstitial transfer factor as adjuvant immunotherapy for experimental glioma*. **B, Pineda, et al., et al.** s.l. : *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 2005, Vols. 24(4): 575-83 .
76. *Effect of transfer factor on myelosuppression and related morbidity induced by chemotherapy in acute leukaemias*. **Fernandez, O. Diaz, et al., et al.** s.l. : *British Journal of Haematology*, 1993, Vols. 84(3): 423-7.
77. *Immunepotent CRP(bovine dyalizable leukocyte extract) adjuvant immunotherapy: a phase I study in non small cell lung cancer patients*. **Franco, Molina MA, et al., et al.** s.l. : *Cytotherapy*, 2008, Vols. 10(5): 490-6.
78. *A study of transfer factor for opportunistic infections in cancer patients*. **SJ, Ketchel, et al., et al.** s.l. : *Medical & Pediatric Oncology*, 1979, Vols. 6(4):295-301.
79. **Zugliani, Antonella.** [Online] *Globo*, Junho 1, 2015. [Cited: Setembro 16, 2015.] <http://oglobo.globo.com/sociedade/saude/tratamentos-que-fortalecem-sistema-imunologico-ganham-forca-no-combate-ao-cancer-16317233#ixzz3kzZICbnQ>.

80. *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous Cell Non- Small-Cell Lung Cancer*. **Julie Brahmer, M.D, et al., et al.** Massachusetts : The New England Journal of Medicine, 2015, Vol. VII.
81. *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. **James Larkin, M:d, PhD, et al., et al.** Massachusetts : The New England Journal of Medicine, 2015, Vol. VII.
82. UCLA Newsroom. *UCLA joins collaboration to advance cancer immunotherapy research*. [Online] UCLA, Abril 23, 2016. [Cited: Abril 24 , 2016.] http://newsroom.ucla.edu/releases/ucla-joins-collaboration-to-advance-cancer-immunotherapy-research?utm_content=sf24474787&utm_medium=spredfast&utm_source=facebook&utm_campaign=External+Affairs&sf24474787=1.
83. *Fundação Portuguesa do Pulmão*. [Online] <http://www.fundacaoportuguesadopulmao.org>.
84. *Portal da Saúde - Ministério da Saúde - Tuberculose*. [Online] <http://www.portaldasaude.pt>.
85. *National Institutes of Health*. [Online] US Department of Health and Human Services. [Cited: Abril 19, 2016.] <https://www.nih.gov/>.
86. *Use of Activated Transfer Factor in Treatment of HIV- Infected Patients*. **Granitov, VM., et al., et al.** Aids and related problems, St Petersburg : Journal HIV, 2002, Russian Journal of HIV/AIDS, Vols. 1,79-80, pp. (6):79-80.
87. *Preliminary observations using HIV-specific tranfer factor in AIDS*. **Pizza, G, et al., et al.** s.l. : Biotherapy, 1996, Vols. 9(1-3): 41-7.
88. *Preliminary results in HIV-1-infected patients treated with transfer factor(TF) and zidovudine(ZDV)*. **Raise, E, et al., et al.** s.l. : Biotherapy, 1996, Vols. 9(1-3):49-54.
89. *Dialyzable leukocyte extract supresses the activity of essential transcription factors for HIV- 1 gene expression in unstimulated MT-4 cells*. **Ojeda, MO, Fernandez, Ortega C and Rosainz, M J.** s.l. : Biochemical & Biophysical Research Communications, 200, Vols. 273(3):1099-103.
90. Dia Mundial da Hepatite 2015 foca na Prevenção da Doença. [Online] Pan American Health Organization. [Cited: Abril 19, 2016.] http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=298%3Adia-mundial-da-hepatite-2015-foca-na-prevencao-da-doenca&Itemid=73&lang=es.
91. **Lopes, M., Schinoni, L. and Schinoni, M.** 2011, Revista de ciências médicas e biológicas, pp. (10):337-344.
92. *Epidemiologia da infecção pelo vírus da Hepatite C*. **Martins, T., Schiavon, Narciso J. and Schiavon, L.** 2011, Revista da Associação Médica Brasileira, pp. (57):107-112.

93. **Infarmed**. Resumo das Características do Medicamento do Harvoni 28 caps. *Infomed*. [Online] Gilead Sciences International, Ltd, Novembro 17, 2014. [Cited: Abril 19, 2016.] www.infarmed.pt/infomed.
94. *The use of Transfer Factor in the treatment of chronic viral hepatitis B and C.* **Annals of the VIII-th. Granitov, VM., et al., et al.** St. Petersburg : s.n., 2002. Congress of Russian-Italian Society on Infectious Diseases. pp. 88-89.
95. **Infarmed**. *Resumo de Características do Medicamento - aciclovir comprimidos 200 mg.* [Online] Junho 07, 1997. [Cited: Outubro 12, 2015.] <http://www.infarmed.pt/infomed>.
96. *Transfer Factor in the treatment of herpes simplex types 1 and 2.* **Khan, A, et al., et al.** s.l. : Dermatologica, 1981, Vols. 163(2):177-85.
97. *Immunotherapy with transfer factor of recurrent herpes simplex type I.* **Estrada, Parra S, et al., et al.** s.l. : Archives of Medical Research, 1995, Vols. 26 Spec No:S87-92.
98. *Comparative study of transfer factor and acyclovir in the treatment of herpes zoster.* **Estrada, Parra S, et al., et al.** s.l. : International Journal of Immunopharmacology, 1998, Vols. 20(10):521-35.
99. Doença do Virus Zika. *Organização Mundial de Saúde*. [Online] Janeiro 2016. [Cited: Abril 20, 2016.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>.
100. *Anemia Falciforme e Infecções.* **Nuzzo, Dayana V.P.Di and Fonseca, Silvana F.** s.l. : Jornal de Pediatria, 2004, Vols. 80, 347-354.
101. *“Aspectos moleculares da anemia falciforme”.* **Galiza, G. Neto and Pitombeira, M G.** s.l. : Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, 2003, Vol. 39.
102. *IL-8 e TNF- alfa: marcadores imunológicos no prognóstico da Anemia Falciforme.* **Cajado, B. A. V. C., et al., et al.** Anemia Falciforme, Brasil : Gazeta Medica da Bahia, 2010, Vols. 80,56-61.
103. *“Alterações imunológicas em pacientes com anemia falciforme.* **Logeto, San, Braga, J. Pellegrini and Carvalho , B. Costa.** Anemia Falciforme, Brasil : Ver. Bras. Alergia Imunopatologia, 1999, Vols. vol 22, 77-82.
104. *Anemia Falciforme: Desafios e Avanços na busca de novos fármacos.* **dos Santos et al, Jesus.** Anemia Falciforme, s.l. : Quimica Nova, 2012, Vols. vol 35, 783- 790.
105. **Infarmed**. *Resumo de Características do Medicamento da Hydrea 500Mg cápsulas.* *Infomed*. [Online] Junho 8, 2011. [Cited: Janeiro 12, 2016.] www.infarmed.pt/infomed.
106. *Anemia Falciforme e infecções.* **Di Nuzzo, Dayana V.P. and Fonseca, Silvana F.** Anemia Falciforme, s.l. : Jornal de Pediatria, 2004, Vols. Vol 80, 347-354.
107. Módulo 3-Resistência microbiana-mecanismos e impactos clínicos. [Online] 2007. [Cited: Abril 20, 2016.]

http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo5.htm.

108. Comunicado. *Direcção Geral de Saúde*. [Online] Agosto 17, 2010. [Cited: Abril 20, 2016.] http://www.misericordiasportuguesas.pt/vePDF.php?pdf=upload/pdf/noticias/1_114_Comunicado%20DGS.pdf.

109. Jornal i. [Online] Outubro 14, 2015. [Cited: Abril 20, 2016.] <http://www.ionline.pt/416822>.

110. *Preparation and determination of immunological activities of anti-HBV egg yolk extraction*. **Xu, YP, et al., et al.** s.l. : Cellular & Molecular Immunology, 2006, Vols. 3(1):67-71.

111. *Las bases de datos*. **Escorsa, Peres and Maspus, Ramón**. 2002, Vols. 3,1-18.

112. *O uso da descoberta de conhecimento em Base de Dados para apoiar a tomada de decisões*. **Azevedo, R, et al., et al.** s.l. : V simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia, 2008, Vols. 1-10.

113. *Ciência brasileira na base de dados do Institute for Scientific Information (ISI)*. **Targino, M and Garcia, J.** s.l. : Ciência da Informação, 2000, Vols. 29,103-117.

114. *Trilogia para la vision cientifica: las publicaciones cientificas, las bases de datos y la bibliometria*. **Sanchez, Yaniorias Rodriguez**. Vols. 31,1-9.

115. *Base de dados*. **Rowley, Jennifer**. Brasília : Biblioteca Electrónica: segunda edição de informática para bibliotecas. Briquet de Lemos, 2002, Vol. 5.

116. *Fundamentos da Base de Dados. Aplicações de Microsoft Access Caso de Estudo: Loja para Crianças*. **Ramos, Pedro**. s.l. : Pós Graduação em Desenvolvimento de Sistemas de Informação DCTI/ISCTE, 2004.

117. **Lawrence, H.S. and W, Borkowsky**. *Biotherapy*. 1996. pp. 9(1-3):p.1-5.

118. *Clinical study of a patient with lupus vulgaris before and after injection of dialyzable transfer factor*. **Horsmanheim, M., Krohn, K. and Virolainen, M.** 1977, Journal of Investigative Dermatology, pp. 68(1): 10-5.

119. **Compston, A. and Coles, A.** *Multiple Sclerosis*. s.l. : Lancet, 2008. pp. 1502-1517. Vol. 372.

120. *Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed*. **Feinstein, A., Freeman, J. and Lo, A.** 2015, The Lancet Neurology, Vol. 14, pp. 194-207.

121. *Transfer Factor Chronicles*. **Roshan, R.** 2004, Redpoint Publishing, Vol. II.

122. *The use of Transfer Factors in the treatment of viral hepatitis patients*. **Karbuisheva, NV., et al., et al.** 2003, Siberian Journal of Gastroenterology and Hepatology, pp. (16):147-149.

123. *Structural nature and functions of transfer factors. (Review)*. **Kirkpatrick, C. H.** Fatores de Transferência, s.l. : Ann NY Acad, 1993, Vols. 685:362-68.

124. **Burmester, Gerd-Rudiger and Pezzutto, Antonio.** *Imunologia - Texto e Atlas*. Lisboa : Lidel, 2005.
125. *Transfer Factor as an adjuvant to non small cell lung cancer(NSCLC) therapy.* **V, Pilotti, et al., et al.** s.l. : Biotherapy, 1996, Vols. 9(1-3): 117-21.
126. Visão. [Online] Cision, 11 14, 2013. [Cited: Abril 19, 2016.]
<http://www.sep.org.pt/images/stories/sep/DOSSIER/2013/11/141113news1.pdf>.

GLOSSÁRIO

ADN - ou DNA, na versão inglesa. O ácido desoxirribonucleico é um composto orgânico cujas moléculas contêm as instruções genéticas que coordenam o desenvolvimento e funcionamento de todos os seres vivos e alguns vírus, e que transmitem as características hereditárias de cada ser vivo. Os segmentos de ADN que contêm a informação genética são denominados genes. O restante da sequência de ADN tem importância estrutural ou está envolvido na regulação do uso da informação genética.

Anticorpo – Molécula formada em resposta ao contacto com um antígeno e que pode unir-se especificamente com esse antígeno.

Antígeno - São moléculas estranhas ao organismo que, quando surgem no interior deste, levam ao desencadear de mecanismos de defesa, nomeadamente, da resposta inflamatória específica.

Geralmente os antígenos são moléculas com elevado peso molecular e grande tamanho, normalmente proteínas ou polissacarídeos, que podem existir livres (por exemplo, toxinas), na superfície de micro-organismos invasores (como bactérias e vírus) ou na zona externa de outros elementos, como pó, grãos de pólen, glóbulos vermelhos estranhos - provenientes de transfusões sanguíneas, tecidos ou órgãos transplantados e parasitas.

O reconhecimento do antígeno pelo sistema imunitário funciona como o elemento desencadeador de uma série de processos de defesa imunitária específica, como, por exemplo, a produção de anticorpos.

Apoptose – Morte (suicídio) celular programada.

BD – ou Base de Dados. Corresponde a um conjunto de tabelas devidamente estruturadas para gerir vastos conjuntos de informação, de modo a facilitar a organização, manutenção e pesquisa de dados.

CD – ou Cluster of differentiation. É a nomenclatura internacionalmente normalizada para antígenos nas superfícies celulares. As populações de células podem ser diferenciadas por meio de anticorpos monoclonais dirigidos contra estes determinantes antigénicos.

CD2 – sigla para Cluster of differentiation 2. É uma molécula de adesão celular encontrada na superfície do linfócito T e células NK.

CD4+ - Linfócito T auxiliar, célula T auxiliadora ou simplesmente CD4 é um leucócito que atua por ativação e estimulação de outros leucócitos de modo a

multiplicarem-se e atacam antígenos. Assim, coordenam a nossa resposta imunológica.

CD8+ - Linfócito T citotóxico. É um linfócito que destrói as células infetadas.

CD16 – sigla para Cluster of differentiation 16. É expresso essencialmente nas células NK.

CD19 – sigla para Cluster of differentiation 19. Enquadra-se dentro da família das imunoglobulinas. Expressa-se especificamente nas células B.

CD56 – sigla para Cluster of differentiation 56. É uma molécula de adesão celular neuronal. É uma glicoproteína expressa na superfície de neurónios, células de glia, músculo esquelético e células NK.

Citocinas – Nome geral para moléculas solúveis que medeiam interações célula- célula.

CRP – Proteína C reactiva é uma proteína plasmática reagente de fase aguda produzida pelo fígado. É um indicador extremamente sensível de inflamação. Permite diagnosticar patologias tais como infeções bacterianas, aterosclerose, isquemia, necroses, entre outras.

DC – sigla para Doença de Crohn. É uma doença inflamatória séria do trato gastrointestinal. Afeta predominantemente a parte inferior do intestino delgado (íleo) e intestino grosso (cólon), mas pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal.

Habitualmente causa diarreia, cólica abdominal, frequentemente febre e, às vezes, sangramento retal. Também podem ocorrer perda de apetite e perda de peso subsequentes. Os sintomas podem variar de leve a grave, mas em geral, as pessoas com doença de Crohn podem ter vidas ativas e produtivas.

DLE – Extrato dialisável de leucócitos.

DTH – Hipersensibilidade de tipo retardado

Elisa – Ensaio de imunoabsorção enzimática que permite a deteção de anticorpos específicos. Este teste é usado no diagnóstico de várias doenças que induzem a formação de imunoglobulinas como por exemplo doenças infecciosas, auto-imunes e alergias.

FT - Fatores de Transferência. Ou TF, Transfer Factors, na versão inglesa. São pequenas moléculas mensageiras imunológicas que têm a função de transferir sinais de reconhecimento entre células, ajudando assim a educar as células imunológicas quanto a um perigo presente ou potencial e contribuindo desta forma na aceleração e reação do organismo perante um problema.

GM-CSF – Fator estimulante de colónias de Granulócitos e Mastócitos. É uma glicoproteína ácida com ponte dissulfeto interna.

HBD-2 – Ou Human Beta Defensin-2 é um peptídeo antibacteriano.

HbF – Hemoglobina fetal.

HLA-C – Os genes do sistema HLA(Human Leucocyte Antigens) são importantes no desenvolvimento de doenças auto-imunes e responsáveis pela rejeição de transplantes de órgãos e tecidos.

IFN – Ou Interferões. São sintetizados por um certo número de diferentes tipos de células, especialmente linfócitos. Desempenham um papel importante na defesa “não específica” contra infeções virais e estão envolvidos na lise de células infetadas, induzindo desse modo a interrupção da replicação do vírus.

IG – Imunoglobulina

IL – Interleucina

IGMRF – IGM fator reumatóide é um ensaio imunoenzimático indirecto em fase sólida. Pode preceder o aparecimento de Artrite Reumatóide por vários anos.

IMC – Imunidade mediada por células

LT – Linfócito T

NAT9 – Ou N-Acetiltransferase-9

NK – Ou células *Natural Killer*, na versão inglesa. São um tipo de linfócitos (glóbulos brancos responsáveis pela defesa específica do organismo). Têm um papel importante no combate a infeções virais e células tumorais. Identificadas pela primeira vez em 1975, foram rotuladas de Exterminadoras Naturais (*Natural Killer*), pela sua atividade citotóxica contra células tumorais de diferentes linhagens, sem a necessidade de reconhecimento prévio de um antígeno específico, contrariamente ao funcionamento dos linfócitos T.

Osteopontina – É uma glicoproteína fosforilada formada na matriz extracelular óssea e presente em tecidos e fluidos orgânicos. É envolvida em vários processos patológicos que incluem inflamação, proliferação celular, progressão tumoral e metástase.

Patogéneos – ou agente patogénico, é um causador ou microrganismo específico que provoca doenças.

PCR –Reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação de ADN sem o uso de um organismo vivo. É usado habitualmente nos laboratórios de investigação médica e biológica para uma variedade de tarefas, como a detecção de doenças hereditárias, testes de paternidade, entre outros.

PCR-RFLP – Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição. Estes marcadores são muito importantes em várias áreas da Biologia.

PHA – Phitohemaglutinina

PRINS – Psoriasis Susceptibility Related RNA Gene Induced by Stress

Rantes – Ou Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted. Tem um papel importante na atração dos leucócitos para as áreas inflamadas.

RAPTOR – Proteína associada reguladora de mTor

RNA_m – É o Ácido Ribonucleico mensageiro. É o ARN responsável pela transferência de informação do ADN até ao local de síntese de proteínas na célula.

Scorad – SCORing Atopic Dermatitis.

Tr – Sigla para Célula T reguladora. É uma célula T supressora que tem um efeito regulador sobre o decurso de respostas imunes de mediação humoral e celular. Por isso as células Tr têm um papel importante na não ocorrência de reações alérgicas e de doenças auto- imunes.

TCR – Recetor de Linfócito T.

Th1 – Linfócitos T auxiliares tipo 1.

Th2 – Linfócitos T auxiliares tipo 2.

Th9 – Linfócitos Th9. Podem estar relacionados com a exacerbação das condições patológicas em alergias e autoimunidade.

Th17 – Linfócitos Th17. Estão associados a patologias de carácter inflamatório.

Th22 – Linfócitos Th22. Estão associados à reparação de tecidos permitindo a contribuição para o desenvolvimento de terapias selectivas e eficazes para doentes com doenças de pele tais como dermatites e psoríase e doenças respiratórias.

Tr – Células T reguladoras.

SLC9A3R1 – Gene associado com a Psoríase.

VEB – Vírus Epstein- Barr. É um vírus da família da Herpes, mais conhecida por mononucleose infecciosa.

VIH – sigla para Human Immunodeficiency Virus. Ou Vírus da imunodeficiência humana, na versão portuguesa. É um retrovírus, classificado na subfamília dos Lentiviridae. Esses vírus compartilham algumas propriedades comuns: período de incubação prolongado antes do surgimento dos sintomas da doença, infeção das células do sangue e do sistema nervoso e supressão do sistema imune.

Causador da Sida, ataca o sistema imunológico, responsável por defender o organismo de doenças. As células mais atingidas são os linfócitos T CD4+. E é

alterando o DNA dessa célula que o HIV faz cópias de si mesmo. Depois de se multiplicar, rompe os linfócitos em busca de outros para continuar a infecção.

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VHS -1 – Vírus do Herpes simples 1

VHS-2 – Vírus do Herpes simples 2

VPH – Vírus do Papiloma Humano

VVZ – Vírus da Varicela Zoster

Texto escrito conforme o Acordo Ortográfico - convertido pelo Lince

ANEXOS

ANEXO 1 – 4LIFE TRANSFER FACTOR TRI- FACTOR FULL PRESCRIBING INFORMATION- PDR.NET

4LIFE TRANSFER FACTOR® TRI-FACTOR FORMULA PRODUCT DESCRIPTION

4Life Transfer Factor Tri-Factor Formula combines proprietary transfer factors and NanoFactor® molecules extracted from bovine colostrum and chicken egg yolk sources. These molecules contain antigen information which educates, enhances, and helps maintain immune system balance.

TECHNICAL DESCRIPTION

Transfer factors are molecules that communicate antigenic immunological information intercellularly and from a donor to a recipient.

They support immune function through cell mediated immunity. Transfers factors, which carry antigen specific information to which all tested immune cells respond, are produced by mononuclear cells and serve to support and improve immune function through cell mediated pathways. Mammalian transfer factors, including those of humans are small molecules between 3,500 and 10,000 daltons.[1,2] Transfer factors are polypeptides that consist of 40 to 44 amino acids [3] and have a conserved region and a variable region. From a molecular biological standpoint, these two properties are analogous to antibodies, however transfer factors' functions of cell mediated immunity (CMI) and non-specific immunological activity differ almost completely from the functions of antibodies. The molecules that have a molecular weight of less than 3,500 daltons modulate immune response but they do not transfer delayed-type hypersensitivity (DTH).[1]

4Life's transfer factors are sourced from the ultra-filtration of colostrum and from egg yolks.[4, 5] The molecules obtained from the spray dried ultra-filtrate of bovine colostrum are of two classes; the transfer factors present in the ultra-filtrate of $\leq 10,000$ daltons and the nanofraction molecules that are present in the nano-filtrate of $\leq 3,500$ daltons.

Transfer factors were first discovered in 1949 by H. Sherwood Lawrence when he demonstrated that CMI could be transferred from one individual to another by way of low molecular weight extracts of white blood cells. Transfer factors could transfer DTH of a specific form from a skin test positive individual to a skin test negative individual who subsequent to the transfer would skin test positive for

that antigen.[6] In a subsequent study in 1955 he demonstrated that DTH could be passed serially, first from a skin test positive individual to a test negative individual, who became test positive, then 6 months later from the second individual to another test negative individual who became test positive.[7] At the time antibodies were the focus of immune research and little was known of the importance of DTH and of the involvement of T-cells in immune response. Transfer factors promote wellness via cell mediated immunity. These compounds are components of colostrum, an infant's first meal. They bridge the generational gap by passing cell mediated immunity from mother to infant.

BIOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL ACTION

Transfer factors' preparations contain more than 200 different moieties of polypeptide molecules with a molecular weight of <10,000 daltons; each moiety potentially having a great number of epitopic variations. These antigen specific factors are synthesized in monocytes and stored in the cytoplasm or on the cell membrane. A significant body of evidence indicates that the primary biological function of transfer factors is to recruit and specifically sensitize previously uncommitted lymphocytes. These sensitized T-lymphocytes initiate the events of cell-mediated immunity, thereby, promoting immunity not only at the site of antigen challenge but also throughout the body.[8] The effect of transfer factors on antigen mediated immunity, via B-cells, is not completely understood; however, clinical studies have reported an increase in particular antibodies, such as IgA and IgG, during transfer factor administration.

Clinical studies have demonstrated that transfer factors' unique ability to express DTH and promote cell-mediated immunity can be transferred from a sensitized donor to a non-immune recipient.[1, 9] This antigen specific effect is well documented and is likely produced through activation of the CD3-antigen site of T-cells, increased macrophage activation, and interleukin production—which can also enhance natural killer cell function.[1, 10]

Although the exact mechanism of action is unknown, research has shown that transfer factors will bind to antigens. However, the antigen specificity that is “transferred” to recipients is mediated by T-lymphocytes.[3] Current structure function models propose that transfer factors have a variable region and a conserved amino acid region, which determines the antigenic specificity for an estimated 8 epitopes [1] and serves as a binding target for immune cell receptors,

respectively.[2, 11] These highly conserved regions presumably allow transfer factors to be administered across a species barrier without any loss of potency. In fact, research has demonstrated that bovine transfer factors are structurally analogous to human-derived transfer factors with equivalent physiological activity. This is further supported by several studies, which used transfer factors extracted from bovine lymph nodes and colostrum to confer cell-mediated immunity to specific antigens in animals and human recipients.[12, 13]

Although most clinical trials with transfer factors have used parental administration; oral administration has also demonstrated successful transfer of DTH and cell mediated immunity in recipients.[14] Dose response studies, which compare various routes of administration, have been performed in both human and animals. Results of these experiments refute any arguments that the acidic or enzymatic environment of the gastrointestinal tract effects oral administration of transfer factors.[14]

CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDIES

Natural Killer Cell Activity

Peripheral blood mononuclear cells were isolated and pooled from several healthy donors. Sixty thousand cells were added to each well of a 96-well microtiter plate. Various immune modulating ingredients, including 4Life Transfer Factor® Tri-Factor® Formula, were added to select wells on the plate and a 48 hour incubation started. At the end of the incubation period 30 thousand K562 cells were added to each well. MTT assay techniques were used to determine the cytotoxic index. The various 4Life Transfer Factor products resulted in cytotoxic indices of 80-98%. By comparison, mononuclear cells incubated with IL-2 for the same 48 hour period produced a cytotoxic index of 88%.

CD4 T Helper Cell Research

Multiple studies were performed using the FDA-approved diagnostic CD4 T Helper cell assay kit and/or a T Cell Memory (CD8) assay kit under development by the same company. Similar to the NK cell research described above these *in vitro* studies were performed on 96-well microtiter plates measuring ATP production via a luciferase-based luminescence reaction.

The CD4 assay utilizes PHA-stimulated cells isolated from whole blood via the use of Dynabeads™. An 18 hour incubation of these isolated, stimulated CD4 cells with the 4Life Transfer Factor products has resulted in a modulation of immune cell activity as exhibited by a decrease in ATP production without a negative impact on cell viability. It is hypothesized that this reduction in ATP production is a result of a redirection in immune cell focus, essentially diminishing the distraction induced by the addition of PHA to the microtiter wells.

Salivary Secretory IgA—Preliminary Investigation

Twenty-four subjects naive to transfer factor supplementation were enrolled in a small-scale, preliminary study. Twenty-one were included in the final analysis. Salivary samples were collected from each subject weekly at roughly the same time of day and day of the week. Saliva was collected over a 5 minute period via passive drool while subjects chewed on a piece of Parafilm™. The samples were put on ice and then frozen at -70°C until assay. The commercial Salimetrics™ salivary IgA assay kit was used for analysis.

Subjects were given 4Life Transfer Factor Tri-Factor formula at 2 capsules per day for two weeks and then transitioned to 4Life Transfer Factor® RioVida® Tri-Factor® formula at 60ml per day for an additional 2 weeks. At the end of the 4 week supplementation period the group showed an average 73% increase in salivary secretory IgA (SIgA) production over their baseline value. Furthermore, none of the 21 subjects showed a SIgA production rate less than their baseline value at the end of the study.

Wellness Research

A study conducted with 30 college students found that either 15 or 30 days of transfer factor administered according to label dose helped them maintain their health. Those that took the product for 30 days showed a prolonged health maintenance than those who took it for only 15 days.[15]

Longevity Studies

Two studies on the effects of 4Life Transfer Factor products on longevity were conducted. An initial, preliminary study was done on mice. This was followed up with a more intricate study on a small group of older men.

Groups of 20 mice each were compared in terms of organ weights, serum immune parameters, strength (dynamometer and hanging time), and isoproterenol-induced salivary hyperplasia. One group was injected with 4mg/kg of a product containing transfer factors. The treatment group showed improvements in all the aforementioned parameters. Isoproterenol-induced salivary gland hyperplasia declines with age. This diminished response is thought to be a consequence of decreased lymphoid cellular regulation of somatic tissue growth. The increased hyperplasia seen in the treatment animals approximated that seen in younger, untreated mice. There were no significant changes noted in height, weight, or rectal temperature between the two groups.[16]

Based on the results of this study an additional study was undertaken in 11 older men aged 55-73. Subjects were given 3 capsules per day of a product containing transfer factors 5 days a week for 6 weeks. At the end of the six week study period a determination of biological age using the Kiev method [17, 18] showed a reduction of approximately four years. There were significant improvements in several parameters of cardiovascular function, hearing, balance, vital lung capacity, ability to hold their breath, and some subjective measures.[16]

Safety

In a study of acute toxicity rats were assessed for fourteen days following a single gavage of 4Life Transfer Factor. Five female SD rats were each gavaged with a dose of 2,000mg/kg. No treatment-related mortalities occurred and there were no clinical signs of toxicity.

No significant difference in body weights occurred. No gross lesions were found at necropsy in any of the animals. Thus, acute toxicity is considered to be greater than 2,000mg/kg.

Since the discovery of transfer factors in 1949 there have been no reports of allergic reactions [1] or of any side effects resulting from long-term use of 10 years or more.

The use of transfer factors is contraindicated in persons receiving immunosuppressive therapy, though actual interactions have not been documented.

HOW SUPPLIED

4Life Transfer Factor® can be found in the following products:

4Life Transfer Factor® Tri-Factor® Formula
4Life Transfer Factor Plus® Tri-Factor® Formula
4Life Transfer Factor® RioVida® Tri-Factor® Formula
4Life Transfer Factor® RioVida® Burst® Tri-Factor® Formula
4Life Transfer Factor® Chewable Tri-Factor® Formula
4Life Transfer Factor® Classic
4Life Transfer Factor® Immune Spray
4Life Transfer Factor® KBU®
4Life Transfer Factor® Kids
4Life Transfer Factor® Belle Vie®
4Life Transfer Factor® Cardio
4Life Transfer Factor® GluCoach®
4Life Transfer Factor® MalePro®
4Life Transfer Factor® ReCall®
4Life Transfer Factor Vista™

REFERENCES

1. Fudenberg, H. and G. Pizza, Progress in Drug Research, 1994. 42: p. 309-400.
2. Lawrence, H.S. and W. Borkowsky, Biotherapy, 1996. 9(1-3): p. 1-5.
3. Kirkpatrick, C.H., Mol Med, 2000. 6(4): p. 332-41.
4. Hennen, W. and D. Lisonbee, U.P. Office, Editor. 2002, 4Life Research, LC: USA.
5. Wilson, G. and G. Paddock, U.P. Office, Editor. 1989, Amtron, Inc.: USA.
6. Lawrence, H.S., Proc Soc Exp Biol Med, 1949. 71(4): p. 516-22.
7. Lawrence, H.S., J Clin Invest, 1955. 34(2): p. 219-30.
8. Levin, A.S., L.E. Spitler, and H.H. Fudenberg, Annu Rev Med, 1973. 24: p. 175-208.
9. Fudenberg, H. and H. Fudenberg, Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1989. 29: p. 475-516.
10. See, D., S. Mason, and R. Roshan, Immunol Invest, 2002. 31(2): p. 137-53.
11. Dwyer, J.M., Biotherapy, 1996. 9(1-3): p. 7-11.

12. Wilson, G.B., R.T. Newell, and N.M. Burdash, Cell Immunol, 1979. 47(1): p. 1-18.
13. Radosevich, J.K., G.H. Scott, and G.B. Olson, Am J Vet Res, 1985. 46(4): p. 875-8.
14. Kirkpatrick, C.H., Biotherapy, 1996. 9(1-3): p. 13-6.
15. Klimov, V. and E. Oganova, in *Euromedica-Hannover 2004*. 2004: Hannover, Germany. p. 15-16.
16. Chizhov, A., et al., in *Euromedica. Hanover*. 2007: Hanover, Germany.
17. Agadzhanian, N., et al., ATMA, 1996.
18. Chebotarev, D., Annals of Gerontology and Geriatrics, 1984.

These statements have not been evaluated by the Food and Drug Administration.
This product is not intended to diagnose, treat, cure or prevent any disease.

ANEXO 2- CASO CLÍNICO MODELO

Nome (codificado), Idade, Sexo

Motivo da consulta

Antecedentes pessoais

Antecedentes familiares

História clínica

Conclusão

ANEXO 3- FOLHETO INFORMATIVO, CONSENTIMENTO INFORMADO E QUESTIONÁRIO MÉDICO

Apêndice 1. Folheto informativo

“CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE ESTUDOS CLINICOS SOBRE FACTORES DE TRANSFERÊNCIA”

Responsáveis: Maria Sofia Soares Fonseca e Professor Doutor Bruno Miguel Nogueira Sepodes e Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Título do estudo: “ Construção de uma base de dados de estudos clínicos sobre factores de transferência”.

Introdução: Os factores de transferência são pequenas moléculas mensageiras imunológicas. São nanomoléculas de péptidos que constam de 44 aminoácidos, com um peso inferior a 5.000 daltons, extraídos de componentes totalmente naturais. Os factores de transferência apresentam três funções, identificadas cada uma com um efeito específico sobre o sistema imunitário: estimular o sistema imunitário deficiente; reprimir o sistema imunitário sobre activo; actuar como agente de memória. Assim, os factores de transferência fortalecem e educam o sistema imunitário, tornando-o mais eficaz permitindo uma resposta mais rápida e segura. (Hurtado) (Elkins, 2000)

Actualmente os factores de transferência encontram evidência científica em várias patologias: autoimunes (artrite reumatóide, lúpus eritematoso, diabetes mellitus tipo I e II, asma, alergias, dermatite atópica, psoríase...); infecto-contagiosas virais (VIH, herpes labial e genital, herpes zoster, hepatite B e C, vírus papiloma humano, citomegalovírus, varicela...); infecções bacterianas (tuberculose, broncopneumonias, amigdalites e otites crónicas, infecção gástrica por *Helicobacter pylori*...); infecções por fungos e parasitas (candidíase, aspergilose, malária, toxoplasmose...); oncológicas (linfoma, leucemia, cancro do pulmão, cólon, mama, próstata...); neurológicas (alzheimer, epilepsia, autismo, esclerose múltipla...). (Elkins, 2000) (D Viza, 2013) (Kirkpatrick, 1996)

Mais de três mil estudos clínicos foram publicados e não há conhecimento de bases de dados destes estudos. É bastante importante organizar todo o conhecimento para que seja mais fácil o acesso aos cientistas, ao pessoal de saúde e ao público em geral. (Elkins, 2000)

Pré-requisitos: Aos voluntários será pedido previamente que completem um questionário médico. Os voluntários seleccionados para a intervenção deverão assinar um consentimento de participação.

Programa do Estudo:

O estudo será realizado durante um período máximo de três meses. Serão realizadas observações/exames e haverá o preenchimento de uma grelha de avaliação adaptada à patologia em questão.

Os resultados das análises efectuadas aos voluntários durante o estudo, serão facultados pelos responsáveis do estudo aos voluntários do estudo quando isso for solicitado pelos mesmos.

Quaisquer questões serão respondidas pelos coordenadores do estudo.

Maria Sofia Soares Fonseca

Professor Doutor Bruno Miguel Nogueira Sepodes

Professor Doutor Rui Manuel Amaro Pinto

Apêndice 2. Formulário de consentimento informado

Consentimento informado do participante

Título do estudo: “CONSTRUÇÃO DE UMA BASE DE DADOS DE ESTUDOS CLINICOS SOBRE FACTORES DE TRANSFERÊNCIA”

Nome do investigador: *Maria Sofia Soares Fonseca*

S/N

1* Eu confirmo que li e entendi o folheto informativo explicando o projecto de investigação em causa e tive a oportunidade de realizar questões acerca do projecto.

☐

2* Eu compreendo que a minha participação é voluntária e que sou livre de me retirar a qualquer momento sem necessitar de justificação e sem haver quaisquer consequências negativas. Para além do mais, se não quiser responder a qualquer questão sou livre de recusar.

☐

3* Eu compreendo que as minhas respostas serão mantidas estritamente confidenciais. Dou a minha permissão para que os membros da equipa de investigação tenham acesso às minhas respostas anónimas. Eu compreendo que o meu nome não estará ligado com a investigação em causa e não serei identificado ou identificável nos relatórios resultantes da investigação.

☐

4* Eu aceito que os dados recolhidos de mim sejam utilizados em futuras

☐

Investigações.

5* Eu aceito fazer parte do projecto de investigação mencionado.



Nome do voluntário

Data

Assinatura

Investigador responsável

Data

Assinatura

Apêndice 3. Questionário médico

A ser completado por cada potencial voluntário e validado pelo seu médico assistente:

Nome:	
Idade:	
Sexo:	
Altura:	
Peso:	
Contacto (número de telefone ou e-mail):	

1* Considera-se uma pessoa saudável?

Sim	Não
-----	-----

2* Está a tomar alguma medicação?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, indique que medicação está a tomar:

3* Já efectuou alguma cirurgia?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, indique qual: _____

4* Tem algum antecedente de doenças metabólicas?

Sim	Não
-----	-----

5* Tem algum historial de alergia e/ou intolerância?

Sim	Não
-----	-----

Se sim, por favor indique qual o tipo:

6* Pratica alguma actividade física?

☐ Sim ☐ Não

Se sim, por favor indique qual e o número de horas por semana com que o faz: _____

Há alguma razão pela qual se considera inapto para participar neste estudo? _____

Nome do participante

Data

Assinatura _____

Nome do médico

Data

Assinatura _____

Investigador encarregado

Data

Assinatura _____

ANEXO 4- PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO DE CASOS CLÍNICOS

Responsável

Refª Caso Data da observação / /

Sexo M F Idade anos

Patologia Antecedentes familiares S
N

Tempo de evolução meses anos

Afeções concomitantes e respetiva medicação

Dia 0

Sintomas

Exames complementares de diagnóstico

Tratamento

Factores de Transferência

Outro

Dias 30, 60 e 90

Avaliação clínica

- 0 Sem melhoria
- 1 Melhoria discreta
- 2 Melhoria ligeira
- 3 Melhoria evidente
- 4 Melhoria acentuada
- 5 Assintomático

ANEXO 5- PATENTES

Número de publicação	US4610878 A
Tipo de publicação	Concessão
Número de candidatura	US 06/504,986
Data de publicação	9 Set 1986
Data de apresentação	16 Jun 1983
Data de prioridade	16 Jun 1983
Estado dos honorários	Pago
Número de publicação	06504986, 504986, US 4610878 A, US 4610878A, US-A-4610878, US4610878 A, US4610878A
Inventores	Gregory B. Wilson , Herman H. Fudenberg
Beneficiário Original	Medical University Of South Carolina
Exportar citação	BiBTeX , EndNote , RefMan
Citações de Patentes (3), Citações Não Provenientes de Patentes (6), Referenciado por (10), Classificações (16), Eventos Legais (13)	
Links Externos: USPTO , Atribuição na USPTO , Espacenet	

Use of in vitro assay techniques to measure parameters related to clinical applications of transfer factor therapy

US 4610878 A

RESUMO

Described herein are methods for quantifying in vitro various parameters related to the use of transfer factor (e.g., dialyzable leukocyte extract containing transfer factor) in the therapeutic and/or prophylactic treatment of patients having antigen-selective defects in cell mediated immunity, so as to standardize such parameters, predict or estimate therefrom the effectiveness of such treatment in vivo, determine optimum dosages and/or administrative regimens therefor and monitor the progress of patients receiving such treatment.

In one embodiment of the invention, the quantification of the various parameters is based upon in vitro assays which measure mediators of cellular immunity produced and released by appropriate leukocytes (e.g., those of the patient before treatment, those of potential donors, those of target cells, those of the patient after treatment with transfer factor, and the like) sensitized to a specific antigen. In another embodiment of the invention the in vitro assays employed are those which provide a measure of tumor-antigen specific cytotoxicity mediated by T cells, i.e., a measure of the increase in activity or number of cytotoxic T cells specific for tumor antigens.

REIVINDICAÇÕES(22)

What is claimed is:

1. A method for quantifying parameters related to the clinical use of transfer factor and/or preparations containing transfer factor, said parameters listed in paragraphs, 1a-1g below, said parameters being selected from the group consisting of:

(1a) documentation of antigen-selective defects in cell-mediated immunity in patients;

(1b) selection of potential donors of body fluids, tissues or cells for the making of preparations containing transfer factor;

(1c) determination of the efficacy of transfer factor in preparations containing transfer factor;

(1d) determination of the responsiveness of the cells of a particular patient to preparations containing transfer factor;

(1e) prediction of a particular patient's in vivo responsiveness to therapy and/or prophylaxis with preparations containing transfer factor;

(1f) determination of dosages of, and administration frequency for, preparations containing transfer factor required for therapy and/or prophylaxis for a particular patient; and

(1g) the monitoring of a particular patient's responsiveness to treatment with preparations containing transfer factor;

said method comprising obtaining by means of in vitro assay techniques, a measure of mediators of cellular immunity produced and released by leukocytes, said leukocytes set out in paragraphs IIa-IIg below, said leukocytes selected from the group consisting of, for said correspondingly-referenced parameters Ia-Ig:

(IIa) leukocytes of a patient in response to a specific antigen:

(IIb) leukocytes of a potential donor in response to a specific antigen;

(IIc) leukocytes of a subject previously determined not to be responsive to a specific antigen, which leukocytes are newly-sensitized to said specific antigen with a preparation containing transfer factor;

(IIId), (IIe), (IIIf) leukocytes of a patient newly-sensitized to a specific antigen with a preparation containing transfer factor; and

(IIg) leukocytes of a patient, who has been treated with a preparation containing transfer factor, in response to a specific antigen;

comparing and correlating said obtained measure of produced and released mediators of cellular immunity to a predetermined standard therefor, and determining the quantification of the parameters of Ia-Ig.

2. The method according to claim 1 wherein said preparation containing transfer factor is obtained from fluids, tissues or cells of any mammalian species.

3. The method according to claim 2 wherein said preparation containing transfer factor is dialyzable leukocyte extract containing transfer factor.

4. The method according to claim 1 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

5. The method according to claim 1 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cel (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

6. A method for quantifying parameters related to the clinical use of dialyzable leukocyte extracts containing transfer factor, said parameters set out in paragraphs Ia-Ig below, said parameters selected from the group consisting of:

(Ia) documentation of antigen-selective defects in cell mediated immunity in patients;

(Ib) selection of potential donors of leukocytes for the preparation of dialyzable leukocyte extracts containing transfer factor;

(lc) determination of the efficacy of transfer factor in a dialyzable leukocyte extract containing transfer factor;

(ld) determination of the responsiveness of the cells of a particular patient to dialyzable leukocyte extract containing transfer factor;

(le) prediction of a particular patient's in vivo responsiveness to therapy with dialyzable leukocyte extract containing transfer factor;

(lf) determination of dosages of, and administration frequency for, dialyzable leukocyte extract containing transfer factor required for therapy and/or prophylaxis for a particular patient; and

(lg) the monitoring of a particular patient's responsiveness to treatment with dialyzable leukocyte extract;

said method comprising obtaining, by means of in vitro assay techniques, a measure of mediators of cellular immunity released or produced from leukocytes, said leukocytes set out in paragraphs IIa-IIg below, said leukocytes selected from the group consisting of, for said correspondingly-referenced parameters Ia-Ig:

(IIa) leukocytes of a patient in response to a specific antigen;

(IIb) leukocytes of a potential donor in response to a specific antigen;

(IIc) leukocytes of a subject, previously determined not to be responsive to a specific antigen, which are newly-sensitized to said specific antigen with dialyzable leukocyte extract containing transfer factor;

(IIId), (IIe), (IIIf) leukocytes of a patient newly-sensitized to a specific antigen with dialyzable leukocyte extract containing transfer factor; and

(IIg) leukocytes of a patient, who has been treated with dialyzable leukocyte extract containing transfer factor, in response to a specific antigen;

comparing and correlating said obtained measure of produced and released mediators of cellular immunity to a predetermined standard therefore; and determining the quantification of the parameters of Ia-Ig.

7. The method according to claim 6 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

8. The method according to claim 6 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cell (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

9. A method for selecting potential donors of leukocytes for the preparation of dialyzable leukocyte extract containing transfer factor for the in vivo treatment of a patient having a defect in cell mediated immunity for a specific antigen, comprising obtaining leukocytes from a potential donor, obtaining by in vitro assay a measure of mediators of cellular immunity released and produced by said leukocytes in response to said specific antigen, and comparing said obtained measure against a predetermined or internal standard indicative of the responsiveness of such leukocytes to specific antigen and of the potential ability of dialyzable leukocyte extract prepared from said donor to confer the ability to produce mediators of cellular immunity in response to said specific antigen in patients having a defect in cell mediated immunity therefor.

10. The method according to claim 9 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

11. The method according to claim 9 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cell (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

12. A method for quantifying the efficacy of transfer factor in a dialyzable leukocyte extract, comprising the steps of:

(a) obtaining from a subject leukocytes previously determined not to be responsive to a specific antigen;

(b) treating said leukocytes with dialyzable leukocyte extract in the presence of said specific antigen;

(c) obtaining by in vitro assay a measure of mediators of cellular immunity produced and released by said leukocytes; and

(d) assigning to said dialyzable leukocyte extract a value correlated to said obtained measure and indicative of the relative ability of said dialyzable leukocyte extract to transfer or confer, in leukocytes previously non-responsive to said specific antigen, the ability to produce mediators of cellular immunity in response to said specific antigen.

13. The method according to claim 12 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

14. The method according to claim 12 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cell (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

15. A method for predicting the effectiveness of in vivo treatment of a particular patient with dialyzable leukocyte extract containing transfer factor, comprising:

(a) obtaining leukocytes from said patient having a previously documented defect in cell mediated immunity for a specific antigen;

(b) treating said leukocytes with a dialyzable leukocyte extract containing transfer factor in the presence of said specific antigen;

(c) obtaining by in vitro assay a measure of mediators of cellular immunity produced and released by said leukocytes; and

(d) comparing said obtained measure to a predetermined standard indicative of the effectiveness of said dialyzable leukocyte extract to transfer or confer to the leukocytes of said patient in vivo the ability to produce mediators of cellular immunity in response to said specific antigen.

16. The method according to claim 15 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

17. The method according to claim 15 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cell (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

18. A method for determining the dosages and administration regimen of a particular dialyzable leukocyte extract containing transfer factor effective to confer in vivo, in a particular patient, the ability to produce mediators of cellular immunity in response to a specific antigen, comprising the steps of:

(a) obtaining a dialyzable leukocyte extract containing transfer factor, said extract having a previously quantified ability, with respect to leukocytes other than those of the particular patient, to transfer or confer to such leukocytes in vitro the ability to produce mediators of cellular immunity in response to said specific antigen;

(b) obtaining a population of leukocytes from said patient;

(c) treating sub-populations of said leukocytes from said patient with varying quantities of said dialyzable leukocyte extract in the presence of said specific antigen;

(d) obtaining a measure, by in vitro assay, of mediators of cellular immunity produced and released by each such sub-population so as to thereby obtain a correlation of various dosages of said dialyzable leukocyte extract and their effectiveness for a particular patient.

19. The method according to claim 18 wherein said in vitro assay technique measures the production and release of mediators of cellular immunity from said leukocytes by means selected from the group consisting of biological, biochemical and immunological means.

20. The method according to claim 18 wherein said in vitro assay technique is selected from the group consisting of macrophage migration inhibition assay, leukocyte migration inhibition assay, active T cell (rosette formation) assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, leukocyte adherence inhibition assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay.

21. A methodology for the therapeutic and/or prophylactic use of dialyzable leukocyte extracts containing transfer factor for patients having defects in cell mediated immunity with respect to a specific antigen, comprising the steps of:

(a) documenting antigen-selective defects in cell mediated immunity in a patient by obtaining leukocytes from a patient, maintaining said leukocytes in vitro in the presence of a specific antigen, obtaining a measure, by in vitro assay, of the production and release from said leukocytes of mediators of cellular immunity and utilizing said obtained measure to identify a specific antigen as to which a defect in cell mediated immunity thereto is exhibited by the patient;

(b) selecting potential donors of leukocytes for the preparation of dialyzable leukocyte extract containing transfer factor for use in treatment of the antigen-selective defect identified in (a) by obtaining leukocytes from a donor, maintaining said leukocytes in vitro in the presence of the specific antigen identified in (a), and obtaining a measure, by in vitro assay, of the production and release of mediators of cellular immunity by such leukocytes in response to such antigen, so as to thereby identify a donor exhibiting production and release of mediators of cellular immunity with respect to the antigen;

(c) preparing dialyzable leukocyte extract from the donor;

(d) quantifying the potency of transfer factor in said dialyzable leukocyte extract by identifying a subject who is not responsive to said antigen, obtaining leukocytes from said subject, maintaining said leukocytes in vitro in the presence of said antigen and said dialyzable leukocyte extract, and obtaining a measure, by in vitro assay, of the production and release by such leukocytes of mediators of cellular immunity with respect to the antigen, so as to thereby assign a value to said dialyzable leukocyte extract indicative of its capability of transferring the ability to produce and release mediators of cellular immunity;

(e) preparing a dosage/response correlation between said dialyzable leukocyte extract and leukocytes of the patient by obtaining leukocytes from the patient, maintaining sub-populations of said leukocytes in vitro in the presence of the specific antigen and varying quantities of said dialyzable leukocyte extract, and obtaining a measure for each such quantity of the production and release of mediators of cellular immunity with respect to the specific antigen; and

(f) administering to the patient a quantity of said dialyzable leukocyte extract determined in (e) to be effective in transferring to leukocytes of the patient the ability to produce and release mediators of cellular immunity with respect to the specific antigen.

22. A method for quantifying parameters related to the clinical use of transfer factor and/or preparations containing transfer factor, said parameters set out in paragraphs Ia-Ig below, said parameters being selected from the group consisting of:

- (Ia) documentation of antigen-selective defects in cell-mediated immunity in patients;
 - (Ib) selection of potential donors of body fluids, tissues or cells for the making of preparations containing transfer factor;
 - (Ic) determination of the efficacy of transfer factor in preparations containing transfer factor;
 - (Id) determination of the responsiveness of the cells of a particular patient to preparations containing transfer factor;
 - (Ie) prediction of a particular patient's in vivo responsiveness to therapy and/or prophylaxis with preparations containing transfer factor;
 - (If) determination of dosages of, and administration frequency for, preparations containing transfer factor required for therapy and/or prophylaxis for a particular patient; and
 - (Ig) the monitoring of a particular patient's responsiveness to treatment with preparations containing transfer factor;
- said method comprising obtaining, by means of in vitro assay techniques, a measure of the T cell mediated, tumor antigen-specific cytotoxicity exhibited by cells of the patient, donor or other appropriate target cells, in the presence of antigen and, where applicable, in the presence of said transfer factor preparation, and determining the quantification of the parameters of Ia-Ig.

DESCRIÇÃO

BACKGROUND OF THE INVENTION

The invention disclosed and claimed herein was made with support of the U.S. Government (NIH Grants R01 CA 25756 and R01 HD 09938) and is subject to certain government rights.

The present invention relates to the fields of immunotherapy and immunoprophylaxis and, more particularly, to the use in immunotherapy or immunoprophylaxis of transfer factor (e.g., dialyzable leukocyte extract containing transfer factor), and to in vitro assay techniques for the purposes of, inter alia, selecting appropriate donors for transfer factor preparations, determining transfer factor potency therein and predicting in vivo responses thereto.

In the mid-1950's, it was first reported that delayed-type cutaneous hypersensitivity (DTH) to tuberculin (PPD) or streptococcal M substance could be passively transferred using extracts of leukocytes obtained from skin-test positive, normal human donors to previously skin-test negative, normal human recipients. Lawrence, H. S. (1955) J. Clin. Invest. 34, 219; Lawrence, H. S. and Papperheimer, A. M., Jr. (1956) J. Exp. Med. 104, 321. In 1963, Lawrence, et al. claimed that dialysates of leukocyte extracts ("dialyzable leukocyte extracts" or DLE) were as

effective in transferring DTH as were whole leukocyte extracts (Trans. Assoc. Am. Physicians, 76, 84 (1963)). The active component(s) of the DLE was at that time termed "transfer factor" (TF), and, believing TF to be the only biological activity present in DLE, the art tended to use the term "transfer factor" alone when referring to transfers produced by DLE. However, since it is now known that DLE contains several hundred chemical moieties, many of which are very active biologically, it is now recognized that use of the term "DLE containing TF activity" is a more accurate description.

Reported attempts to use DLE containing TF for immunotherapy and/or immunoprophylaxis increased dramatically beginning in the early 1970's when we and others first successfully used DLE to treat patients with genetically determined immunodeficiency disease and demonstrated that DLE could, in addition to transferring antigen-specific, delayed-type cutaneous reactivity, also confer (a) resistance to and prophylaxis against infection and (b) the ability to produce antigen-specific mediators of cellular immunity. Although DLE has been used to treat a variety of patients with inherited or acquired immunodeficiency diseases, neoplasia, and many infectious diseases of viral, fungal, protozoal or mycobacterial etiology, the success of clinical trials to date has been extremely variable, even for a single disease or syndrome.

One reason for the variable clinical results with DLE has been the lack of a rapid in vitro test suitable for selecting leukocyte donors, for evaluating the potency of TF in DLE preparations obtained from donor leukocytes, for predicting the response of a patient to immunotherapy with DLE and for determining the frequency and amount of DLE for immunotherapy or immunoprophylaxis. In the past, most investigators used only transfer of DTH (skin tests) in normal volunteers or patients, since this was the only accepted measurement of TF activity in DLE. However, in vivo skin test assays have many drawbacks: (a) In many disorders of infectious etiology, antigens suitable for in vivo skin testing are not available; (b) Systemic conversion of DTH reactivity requires relatively large amounts (several milliliters) of DLE; thus, extensive skin testing in normal healthy volunteers to document the presence of a given TF in the preparation of DLE is not cost-effective. An in vitro assay for TF in DLE would require at least 1000-fold less DLE for testing; and (c) Skin testing is neither quantitative nor particularly sensitive, and the in vivo response to DLE is too variable among the different recipients to allow for determining TF potency or for predicting how much DLE a given patient should receive.

In the past few years, the applicants have documented that assays which measure the production of mediators of cellular immunity, e.g., production of leukocyte migration inhibition factor (LIF) as measured by the agarose leukocyte migration inhibition (LMI) assay, can be employed as an in vitro test for detecting TF activity in DLE, a finding confirmed by two other groups of investigators. See, Wilson, G. B., and Fudenberg, H. H., *Lymphokines* 4, 107 (1981); Borkowsky, W., and Lawrence, H. S., *J. Immunol.* 123, 1741 (1979); Sirianni, M. C., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 14, 300 (1979). These findings led to the possibility, now set forth in the present invention, of actually quantifying various parameters related to TF therapy and prophylaxis by in vitro assay (e.g., to compare TF potencies of various preparations, to determine how much TF preparation should be given to a particular patient, to test patient's

cells to determine whether antigen-specific responsiveness can be induced by particular TF preparations, and the like).

SUMMARY OF THE INVENTION

According to the present invention, in vitro assays which provide a measure of mediators of cellular immunity produced and released by leukocytes (lymphocytes, monocytes, macrophages) sensitized to a specific antigen, such as the leukocyte migration inhibition assay, are employed to (a) document antigen-selective defects in cell mediated immunity in patients; (b) select potential donors of fluids, tissues or cells from which TF (e.g., DLE containing TF) for use in immunotherapy and immunoprophylaxis can be attained; (c) quantify the potency of transfer factor in various preparations (e.g., DLE); (d) test a patient's cells for responsiveness to TF preparations (e.g., DLE containing transfer factor) and to predict therefrom in vivo responsiveness; (e) determine dosages and administrative regimens of TF preparations (e.g., DLE containing TF) for immunotherapy and immunoprophylaxis; and (f) monitor a patient's response to treatment with transfer factor.

The methods of the present invention materially enhance the attainment of consistent, improved, efficacious results of using transfer factor (e.g., DLE containing TF), and makes it possible to standardize TF preparations according to antigen-selectivity and potency so as to greatly increase the potential for achieving the uniformity and predictability required of such products or preparations.

According to a particular embodiment of the present invention, antigen-selective defects in cell mediated immunity in a patient are documented by in vitro assay techniques. In this method, leukocytes obtained from a patient are grown in vitro and assayed, in the presence of various antigens, to obtain, either directly or indirectly, a measure of the mediators of cellular immunity produced and released by the leukocytes in response to each particular antigen. By comparison of the obtained measures against predetermined or internal standards, antigens as to which the patient exhibits a defect (in whole or in part) in cell mediated immunity can be identified.

In another embodiment of the invention, potential donors of fluids, tissues or cells from which TF can be obtained (e.g., leukocytes for the preparation of DLE) can be selected by in vitro assay techniques. Thus, for example, where it is desired to produce DLE containing TF which would produce antigen-specific mediators of cellular immunity, leukocyte donors are selected on the basis of their responsiveness to the specific antigen. Leukocytes obtained from a variety of potential donors are grown in vitro in the presence of specific antigen and assayed to obtain a measure of production and release of mediators of cellular immunity. Comparison of the obtained measures to predetermined or standard values is then used to select those donors having potential as a source of DLE capable of transferring the ability to produce mediators of cellular immunity to the specific antigen.

According to another embodiment of the invention, a TF preparation (e.g., DLE containing TF) obtained from a suitable donor is quantitated as to its TF potency for specific antigen. Thus, for

example, leukocytes previously determined to be non-responsive to specific antigen are cultured in vitro with specific antigen and with DLE, and there is obtained by assay a measure of mediators of cellular immunity produced and released by the leukocytes. This measure can be standardized against predetermined or internal controls to obtain a measure of TF "potency", i.e., a measure of the ability of the TF to transfer or confer the ability to produce antigen-specific mediators of cellular immunity.

In another method according to the invention, it can be determined by in vitro assay whether a TF-containing preparation (obtained from appropriate donors and of some quantified TF potency) will actually effect transfer of antigen-specific cell mediated immunity to the patient. Thus, for example, leukocytes from the patient are grown in vitro with DLE containing TF and specific antigen, and a measure of the production and release of mediators of cellular immunity as to the specific antigen is obtained by assay to indicate the degree of effectiveness of transfer. In the same way, optimum TF (e.g., DLE containing TF) dosages and administration regimens can be determined by growing the patient's leukocytes in the presence of antigen and varying quantities of DLE. Assayed measures of mediators of cellular immunity permit a correlation (e.g., a dose-response curve) from which minimum or optimum effective dosages can be determined.

Still another feature of the present invention is the ability to monitor the continued effectiveness of TF in a patient receiving treatment (e.g., with DLE containing TF) for therapy or prophylaxis by periodically assaying leukocytes obtained from the patient, in the presence of antigen, for a measure of the production and release of mediators of cellular immunity.

As earlier noted, the in vitro assaying techniques useful in the present invention include those techniques which provide a measure, either directly or indirectly, of the production of mediators of cellular immunity by lymphocytes, macrophages, monocytes sensitized to specific antigen. While the leukocyte migration inhibition (LMI) assay is preferred in this regard (measuring leukocyte migration inhibitory factor--LIF), a number of other such assays may be employed. For example, there can be used a macrophage migration inhibition assay, active T cell assay, resynthesized lymphocyte SRBC receptor assay, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity inhibition assay, leukocyte adherence inhibition assay and resynthesized Fc receptor assay. Examples of these and other potentially useful in vitro assays are given in H. H. Fudenberg, et al., "Dialyzable Leukocyte Extracts (Transfer Factor)--A Review of Clinical Results And Immunological Methods For Donor Selection, Evaluation of Activities And Patient Monitoring", in "Thymus, Thymic Hormones and T Lymphocytes", p. 391 (Academic Press, N.Y. 1980); H. H. Fudenberg, et al., "Immunotherapy With Dialyzable Leukocyte Extracts And Studies Of Their Antigen-Specific (Transfer Factor) Activity", Proc. Virchow Pirquet Med. Soc., 34, 3-87 (1980); and K. Y. Tsang, et al., "Osteosarcoma-Specific Dialyzable Extracts: Prophylaxis Post-Surgery In An Animal Model Of Human Osteosarcoma", in Fourth International Transfer Factor Workshop, p. 156 (Academic press, 1983), all of which are incorporated herein by reference.

Regardless of the assay employed, the actual mechanism for measuring produced and released materials is not critical and can be either biological (e.g., using target cells or tissues), biochemical (e.g., activating metabolites of a cell) or immunologic (e.g., immunoassays employing antibodies, polyclonal or monoclonal, to the mediators in question).

In the present invention, "transfer factor" includes transfer factor obtained from any mammalian species (including birds), since it is known that antigen-specific cell mediated immunity can be transferred across species lines. See, e.g., G. B. Wilson, et al., "Bovine Dialyzable Lymph Node Extracts Have Antigen-Dependent And Antigen-Independent Effects On Human Cell Mediated Immunity In Vitro", *Cell. Immunol.*, 47, 1-18 (1979); G. B. Wilson, et al., "Bovine `Transfer Factor`; An Oligoribonucleopeptide Which Initiates Antigen-Specific Lymphocyte Responsiveness", *Thymus*, 4, 335-350 (1982); and G. B. Wilson, et al., "Transfer Of Cell-Mediated Immunity In Vitro To Human Lymphocytes Using Dialyzable Leukocyte Extracts From Immune Burros", in *Fourth International Transfer Factor Workshop*, p. 213 (Academic Press 1983).

In addition, the transfer factor (although generally illustrated throughout as a DLE containing transfer factor) can be obtained from any body fluid, tissues or cells of such species capable of providing TF, including the supernatant obtained in culturing immune cells in vitro. TF-containing preparation can be employed in crude or fractionated/purified form.

In the following more detailed description of this invention, a particular case report is presented of a patient having a specific disease in order to illustrate in detail the various applications of an in vitro assay (here, the LMI assay) to transfer factor (here, DLE containing TF) immunotherapy. As will be apparent to those skilled in the art, the techniques and methods hereinafter described for this particular case can be applied to a host of patients and diseases and can make use of assay techniques and transfer factor preparations other than those specified.

DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

FIG. 1 represents the dose-response curve used to calculate the potency of PPD-F-specific TF in DLE preparation 2, described hereinafter. The MI_A and MI_B values indicate migration inhibition produced by DLE alone (quantifies non-specific adjuvant components in DLE) or DLE plus PPD-F (100 ug/ml) when incubated with peripheral blood leukocytes obtained from normal healthy subjects nonresponsive to PPD-F. Each point is the mean \pm SEM for three or more determinations using leukocytes from different donors. The % D_B and potency were calculated as described hereinafter. The MI_A and MI_B values for DLE concentrations above 40 ul were obtained after concentrating the preparation five-fold. The number of TF potency units per milliliter was calculated by dividing 45 (ul) into 1000 (ul/ml).

FIG. 2 is a chart illustrating the patient's clinical response to immunotherapy with DLE containing TF specific for PPD-F. The migration index (MI) indicates the response of the patient's cells to PPD-F as determined by the leukocyte migration inhibition assay. An $MI > 0.85$ indicates no significant response to PPD-F. IU in the Figure is international units (however,

other units can be used, e.g., mls.). The results for sputum smears and cultures indicate the presence or absence of *M. fortuitum* and the extent of growth, respectively.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION A. Patient

The patient had pulmonary fibrosis documented (over 10 years earlier) by lung biopsy. The patient had a flu-like illness, characterized by cough, malaise, and myalgias. During the following 6 months he gradually developed weight loss, weakness, and a cough productive of yellow sputum.

Chest roentgenograms showed extensive destruction of the right lung with alveolar and interstitial shadows present on both the right and left sides. Culture of the sputum produced a heavy growth of *M. fortuitum*. The patient was treated with standard antituberculosis drugs, to which he showed no response. After 4 months this therapy was stopped and the patient was reevaluated.

Chest roentgenograms at that time revealed increased alveolar and interstitial densities at both bases and pleural thickening on the right. A transbronchial lung biopsy showed caseating necrosis and grew *M. fortuitum* when cultured. The patient was started on amikacin with good clinical response within a month. After 6 months of intermittent therapy with amikacin, both drug resistance and drug toxicity developed and amikacin was discontinued. The patient was later readmitted with hemoptysis and easy fatigability. Chest roentgenograms showed a large cavity with an air fluid level in the right mid-lung zone and a small cavity in the left lateral lung zone.

B. Materials and Methods For Use In Immunologic Evaluation

Preparation of dialyzable leukocyte extracts

DLE was prepared from the leukocytes of normal healthy volunteers with demonstrated reactivity to *M. fortuitum* (PPD-F) (shown by the direct agarose LMI assay as described in G. B. Wilson, et al., "Effects Of Dialyzable Leukocyte Extracts With Transfer Factor Activity On Leukocyte Migration In Vitro. I. Antigen-Dependent Inhibition And Antigen-Independent Inhibition And Enhancement Of Migration", J. Lab. Clin. Med., 93, 800-818 (1979)) as described previously. See Welch, T. M., et al. in "Transfer Factor: Basic Properties and Clinical Applications" (M. S. Ascher, et al., Eds.), p. 399, Academic Press, N.Y., 1976, incorporated herein by reference. Lyophilized dialysates of freeze-thawed leukocytes were reconstituted in pyrogen-free distilled water at a concentration equal to 5×10^8 mononuclear leukocyte (MNL) equivalents per milliliter. This concentration of DLE is equal to 5 international units (IU) of DLE. All preparations of DLE were determined to be sterile prior to use in vivo or in vitro.

Donors of target cells for evaluating DLE potency.

Normal healthy adult volunteers served as donors of target cells (peripheral blood leukocytes, PBL) for use in evaluating the potency of TF specific for PPD-F in the various preparations of

DLE. All of these normal subjects were shown to be nonresponsive initially to PPD-F (migration indices >0.90 in response to PPD-F) by the LMI assay.

Leukocyte migration inhibition assay.

Cell-mediated immunity to *Candida* (Hollister-Stier, Berkeley, Calif.), SK-SD (streptokinase-streptodornase, Lederle, Pearl River, N.Y.), PPD-F (purified protein derivative from *Mycobacterium fortuitum*), PPD-S (purified protein derivative from *Mycobacterium tuberculosis*, Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark), mumps (Lilly, Berkeley, Calif.), dermatophytin (Hollister-Stier, Berkeley, Calif.), and PHA (Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England) was evaluated by the direct LMI assay in accordance with procedures described in Wilson, G. B., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 93, 800 (1979) and Kyong, C. U., et al., *Amer. J. Med.* 68, 955 (1980), incorporated herein by reference. PBL (2.0×10^8 cells/ml) were incubated with medium only (control) or test substances (antigen or mitogen) at 37° C. in a humidified incubator gassed with 5% CO_2 in air, for 90 min when *Candida*, SK-SD, mumps, or dermatophytin was employed and for 60 min when PHA, PPD-F, or PPD-S was used. PHA was employed at either 5 or 1 $\mu\text{g/ml}$; *Candida* at a dilution of 1/10, 1/20, or 1/40; SK-SD at 8000:2000, 4000:1000, 800:200, or 400:100 units/ml; PPD-S or PPD-F at 100 $\mu\text{g/ml}$; mumps at a dilution of 1/5, 1/10, or 1/20; and dermatophytin at a dilution of 1/30 or 1/60. The optimal concentrations of PHA and all antigens had been determined previously as described in Metcalf, J. F., et al., *Amer. J. Med.* 71, 485 (1981) and Kyong, supra. Responsiveness to antigen or mitogen is expressed as a migration index (MI), where $\text{MI} = \frac{\text{migration in test substance}}{\text{migration in control}}$. For the highest concentration of each test substance used, an MI less than 0.80 indicates responsiveness [induction of production of leukocyte migration inhibitory factor (LIF)] to PHA; an MI less than 0.85 indicates responsiveness to *Candida*, dermatophytin, PPD-S, or PPD-F; and an MI less than 0.90 indicates responsiveness to mumps or SK-SD.

Determination of TF potency in DLE.

The procedure for determining TF potency in DLE is briefly summarized below for the four preparations of DLE tested in this study. A detailed description of the procedure, as it relates to the detection of TF activity in DLE, has been published previously, Wilson, G. B., and Fudenberg, H. H., *Lymphokines* 4, 107 (1981), incorporated herein by reference. (a) Aliquots of target cells (PBL) from three or more normal donors nonresponsive to PPD-F by LMI ($\text{MI} \geq 0.90$) were incubated in either medium alone, medium plus PPD-F (100 $\mu\text{g/ml}$), DLE (at various concentrations) in medium, or DLE (at various concentrations) plus PPD-F in medium for 30 min at 37° C. in a humidified incubator gassed with 5% CO_2 in air, before neutrophil migration. (b) After neutrophil migration (6-18 hr), the effects of PPD-F alone, DLE alone, and DLE plus PPD-F were quantitated by determining three migration indices termed, respectively, the MI, MI_A , and MI_B . The MI_A value quantitates antigen-independent (LIF-independent) LMI produced by non-TF components. MI_A values ≤ 0.80 indicate significant antigen-independent effects. The MI_B value quantitates antigen-dependent LMI induced by LIF released from T lymphocytes newly sensitized by TF in the presence of specific antigen. An MI_B value < 0.90 indicates meaningful

antigen-dependent LMI. In this study all concentrations of DLE were evaluated using target cells from at least three donors, and each donor's cells were tested in three to six replicate cultures. The MI, MI_A, and MI_B values given below are the mean±SEM for all determinations.

All four DLE preparations were initially tested over a concentration range of 1 to 50 ul DLE per 100-ul cell suspension to determine a "working range" of concentrations for evaluating their TF potency. When the proper working range of DLE preparation is determined, the highest concentrations of DLE should produce mild antigen-dependent LMI (MI_A between 0.80 and 0.70), which should be accompanied by antigen-dependent specific LMI if an appropriate antigen is employed (i.e., PPD-F in this study). At intermediate concentrations of DLE, only antigen-dependent specific LMI should be produced, whereas at low or suboptimal concentrations of DLE only antigen-independent enhancement of migration (MI_A >1.10) or no effect at all should be seen. The potency is determined by using the intermediate concentration range, where only antigen-dependent LMI is produced.

From our experience in testing many preparations of DLE made in our laboratory and provided by other investigators, we have noted three problems which are sometimes encountered: (a) the DLE may be too dilute, (b) it may promote marked enhancement of PMN migration over a wide range of concentrations, or (c) it may be too toxic or produce pronounced migration inhibition over a wide concentration range. To overcome the first problem we simply relyophilize the DLE to concentrate it as much as 5- to 20-fold, after which the three effects noted above are usually observed.

Enhancing activity may be present if the DLE is too dilute or if it contains too high a concentration of non-TF components (relative to TF) which can (a) promote antigen-independent enhancement of PMN migration or (b) inhibit or suppress the effects of TF. We have previously demonstrated both components in DLE, particularly in preparations obtained from "buffy coat" cells rich in platelets. In these cases, the crude DLE preparations may never demonstrate TF activity regardless of the concentrations tested in vitro, and the TF may need to be purified or the suppressor or inhibitor removed prior to determining TF potency (see below).

Preparations which are too toxic or produce pronounced antigen-independent LMI over a wide concentration may simply be diluted or, alternatively, an aliquot of the preparation may be fractionated by Sephadex G-25 chromatography to obtain TF free of components promoting antigen-independent LMI (this method or others can be used for the purification discussed above). The aliquot of partially purified TF may then be tested in vitro to determine the TF potency of crude DLE. The rest of the crude DLE preparation may then be used for immunotherapy, since the components producing antigen-independent LMI appear to be nonspecific immunopotentiators (adjuvants) which might be beneficial to the patient.

After the "working range" of each DLE preparation was determined, the % D_B values were calculated from the MI_A and MI_B values obtained for the intermediate range of each dose-response curve. The % D_B is the parameter actually used to quantitate the TF activity in DLE, where

$$\%D_B = [1 - (MI_B / MI_A)] \times 100.$$

Values greater than 15-20% are highly significant.

The TF potency of each DLE preparation was then determined (see FIG. 1). After determining the lowest concentration of DLE (microliters per 100-ul target cell suspension) which can produce a $\%D_B$ of 20 while promoting an MI_A value of ≥ 0.90 but < 1.00 , the potency units per milliliter DLE are quantitated by dividing this value into 1000 (The DLE is normally in 1.0 ml aliquots.). For example, if a preparation of DLE produces a $\%D_B$ of 20 at 20 ul, then 1.0 ml of the preparation contains 50 potency units.

Determination of responsiveness of the patient's cells to DLE in vitro.

After each preparation of DLE was evaluated for TF potency in vitro using normal leukocytes, the ability of each preparation to convert the patient's cells to responsiveness to PPD-F in vitro was determined. In this phase of the study a protocol identical to that above was employed, except that evaluations with the patient's cells were restricted to testing each DLE preparation at concentrations known to produce $\%D_B$ values of $> 15-20\%$ when incubated with target cells from normal healthy controls (i.e., the intermediate concentration range of each dose--response curve was employed).

Estimation of Dosage of DLE for Immunotherapy.

Evaluation of representative DLE preparations used in our past clinical trials indicated that for DLE preparations containing 100 potency units per ml, 5 IU or 1.0 ml of DLE should be given. In the present study, we attempted to adhere closely to this ratio.

Other methods.

Active, inactive and total T cells, serum immunoglobulins, and PHA and concanavalin A (Con A)-induced lymphocyte DNA synthesis responses were determined, for the purpose of assessing the relative intactness of the patient's immune system, as described previously. See Metcalf, J. F., *supra* and Kyong, C. U., *supra*. See generally, H. H. Fudenberg, et al., "Dialyzable Leukocyte Extracts (Transfer Factor)--A Review Of Clinical Results And Immunological Methods For Donor Selection, Evaluation Of Activities And Patient Monitoring", in "Thymus, Thymic Hormones And T Lymphocytes", p. 391 (Academic Press, N.Y. 1980).

C. Results

Initial Evaluation of the Patient's Cell-Mediated Immunity.

After the patient was taken off amikacin therapy, immunologic evaluation indicated that he had seemingly intact cell-mediated immunity. Measurements of total white cells and lymphocytes were within normal limits and remained so throughout the period of study. Values for total T

cells (range 63 to 80%) and active T cells (range 34 to 37%) were in the upper range of the normal levels of $68 \pm 8\%$ and $25 \pm 6\%$ (mean \pm SD), respectively. Serum immunoglobulins G, A, and M were also within normal limits. PHA- and Con A-induced lymphocyte DNA synthesis were low normal and normal, respectively, and remained unchanged throughout the study. In vitro testing with the LMI assay, however, suggested an antigen-selective defect in CMI for *M. fortuitum* (Table 1). The patient's cells responded to PHA, Candida, dermatophytin, mumps, SK-SD, and PPD-S, but not to PPD-F (MI=0.90). It was decided therefore to initiate immunotherapy with DLE containing TF specific for PPD-F.

Selection of Leukocyte Donors and Evaluation of TF Potency in Vitro.

Selection of potential leukocyte donors for DLE was based on demonstrated reactivity to PPD-F as shown by the LMI assay. Table 2 (second column) shows the MI value obtained for the normal healthy volunteers who provided cells for the preparation of DLE. Each lot of DLE was evaluated for PPD-F specific TF potency using target cells from normal subjects shown to be nonresponsive to PPD-F by LMI. The PPD-F-specific TF potency units per milliliter of each preparation are listed in Table 2, and FIG. 1 shows the entire dose--response curve or potency curve for DLE preparation 2.

TABLE 1

PATIENT'S CELLULAR IMMUNE STATUS BEFORE IMMUNOTHERAPY AS SHOWN BY LEUKOCYTE MIGRATION INHIBITION ASSAY							
	Migration index (MI) ^a in presence of						
	PHA	Candida	SK-SD	PPD-S	PPD-F	Mumps	Dermatophytin
Patient	0.64	0.68	0.70	0.67	0.90	0.70	0.57
Normal healthy controls ^b	0.35-0.75	0.59-0.78	0.65-0.85	0.50-0.79	0.60-0.70	0.70-0.89	0.57-0.80

^aMI, calculated as described under Materials and Methods. Concentrations used: PHA, 5 ug/ml; Candida 1:10; SK-SD, 8000:2000 units/ml; PPD-S, 100 ug/ml; PPD-F, 100 ug/ml; mumps, 1:5; dermatophytin, 1:30.

^bRange of responses for normal healthy controls tested during same time period as the patient.

TABLE 2

EVALUATION OF DLE PREPARATIONS IN VITRO AND THE PATIENT'S RESPONSES IN VIVO AND IN VITRO							
DLE preparation	Donor's response to PPD-F ^a	In Vitro potency of DLE ^b	Recommended dosage of DLE for immunotherapy based on potency		Response of patient's cells in vitro when incubated with DLE ^d	Dose of DLE used for therapy (IU) ^c	Response to <i>M. fortuitum</i> in vitro after DLE injection ^e
			IU ^c	ml			
1	0.70	<5	>100	20.0	No Response	40	No (inhibitor present?)
2	0.61	22.2	22.5	4.5	28	20	Yes
3	0.55	12.5	40.0	8.0	21	30	Yes
4	0.68	50	10.0	2.0	N.T.	20	Yes

^aMI value in response to PPD-F determined by leukocyte migration inhibition, MI <0.85 indicates response to PPD-F.

^bTF potency units per milliliter DLE. Based on testing cells obtained from normal donors nonresponsive to *M. fortuitum* by leukocyte migration inhibition. TF potency as defined under Materials and Methods.

^cInternational units. One IU is the material from 1×10^8 mononuclear cells, in a volume of 1.0 ml.

^d% D₅₀ value (see Materials and Methods).

^eSee FIG. 2 for MI values in response to PPD-F after DLE therapy.

Preparations 1 and 3 were too dilute when initially tested over a concentration range of 1 to 50 ul (both preparations produced enhancement of neutrophil migration at the highest concentration employed), and were therefore lyophilized, resuspended at five times their original concentrations, and retested. When DLE preparation 1 was retested, significant antigen-dependent LMI could not be demonstrated at any concentration. At high concentrations (>250 ul) preparation 1 produced pronounced migration inhibition, while at lower concentrations (10 to 80 ul) it enhanced neutrophil migration. Intermediate amounts of preparation 1 (90-200 ul) enhanced neutrophil migration in the presence of PPD-F over that seen without PPD-F (MI_B

>MI_A) for target cells from some donors, and for others insignificant antigen-dependent LMI was obtained. These results suggested the presence of large amounts of components capable of inhibiting TF effects in DLE preparation 1. Based on these results, A TF potency of <5 units/ml was recorded for preparation 1, indicating that this preparation would probably have little or no therapeutic benefit.

When DLE preparation 3 was retested, its TF potency was calculated at 12.5 units/ml (Table 2). DLE preparation 2 (22.2 potency units per ml) was also concentrated after initial testing, primarily to obtain data for the "high dose" segment of the potency curve (FIG. 1). Preparation 4 (50 potency units per ml) did not require concentration.

Effects of DLE on the Patient's Clinical and Laboratory Parameters.

In September 1979 the patient was started on immunotherapy with DLE. FIG. 2 presents a summary of his clinical course for the period September 1979 to March 1981. Initially, 40 IU of DLE preparation 1 was administered; however, by December 1979 the patient's clinical condition had not improved and no response to PPD-F could be detected (MI=0.91). In December 1979 he was given 20 IU of DLE preparation 2; when he was evaluated 3 weeks later (January 1980) he had developed a positive response to PPD-F in vitro and demonstrated clinical improvement (no hemoptysis, negative sputum smear). He received 10 IU of DLE preparation 2 on April 1980 and was stable clinically until October 1980, when his general clinical condition worsened. At that time his sputum smear was positive for *M. fortuitum* and no in vitro response to PPD-F could be detected by the LMI assay (FIG. 2). During this period we first evaluated the four preparations of DLE for PPD-F-specific potency. Based on our results (Table 2) the patient received 20 IU of DLE preparation 4 early in November 1980. Two weeks later his response to PPD-F had converted to positive when tested in vitro (FIG. 2).

Since November 1980 the patient has received prophylactic injections of DLE preparation 3 or preparation 4 every 4 to 6 months and has required no antituberculosis medication. Chest roentgenograms taken in March 1981 showed diminution of the major cavity with disappearance of the air fluid in the right lung and contraction and thickening of the pleura overlying the right lung. Also, the small cavity initially present in the left lung was no longer evident. A repeat transbronchial lung biopsy performed in April 1981 showed no caseation, in contrast to the overwhelming caseation present prior to the initiation of DLE therapy.

D. Discussion

M. fortuitum occurs widely in soil and is usually not considered a pathogen in man, since it rarely causes disease in healthy individuals. In a large series of patients with malignancy, however, *M. fortuitum* was the second most common cause of mycobacterial disease. The patient described in this study seems to represent yet another instance in which *M. fortuitum* may cause serious disease, namely, when the patient's immune system is compromised due to an antigen-selective defect in CMI to the organism (Table 1).

We decided to institute immunotherapy with DLE containing TF specific for *M. fortuitum* for several reasons: (a) The patient had long-standing pulmonary fibrosis and a severe pulmonary parenchymal infection with *M. fortuitum*, which was refractory to treatment with standard antituberculosis medications and amikacin; (b) The patient appeared to have an antigen-selective defect in CMI to the infecting organism (Table 1); (c) Other than the selective defect to PPD-F, the patient's efferent CMI seemed relatively intact. (Past attempts to use DLE for immunotherapy have been particularly successful in patients with demonstrated antigen-selective defects in CMI but with efferent CMI responses otherwise intact); (d) DLE has been used as an immunotherapeutic agent with some degree of success (as judged by clinical improvement) in patients with disease resulting from infection with *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare*, or *M. avium*.

When DLE preparations of known in vitro TF potency (Table 2) were used and therapeutic injections of DLE were administered in amounts commensurate with their TF potency, successful induction of responsiveness of PPD-F in vivo was obtained (FIG. 2). In addition, over the course of treatment, the patient has shown gradual clinical improvement (FIG. 2), his responsiveness to PPD-F has been maintained with prophylactic injections of DLE every 4-7 months (FIG. 2), and he has not required antituberculosis medications of any kind.

The predictive value of the LMI assay with respect to whether or not a patient will respond to TF (DLE) therapy is evident from the good correlation found in this study between the response to the patient's cells in vitro (Table 2) and his response to PPD-F after injections with DLE (FIG. 2). Preparations of DLE from different donors may differ markedly in their TF potency; for example, although all of our donors were selected on the basis of demonstrated responsiveness to PPD-F by LMI, the final TF potency of the preparations varied from 50 to less than 5 units/ml (Table 2). The LMI assay is of particular value here, since in treating out patient it was possible to gauge how much DLE should be administered for immunotherapy or immunoprophylaxis after the potency was determined. Finally, our results demonstrate that some preparations of DLE may be completely useless therapeutically even though the DLE donor has demonstrated CMI to the organism in question. Undoubtedly, many past clinical failures can be attributed to the use of DLE preparations with insufficient TF potency.

CITAÇÕES DE PATENTES

Patente Citada	Data de apresentação	Data de publicação		Requerente	Título
US3988115 *	18 Set 1975	26 1976	Out	Modabber Farrokh Z	Diagnostic method for determining pathological condition by antigen-combining capacity of

Patente Citada	Data de apresentação	Data de publicação	Requerente	Título
				lymphocytes
US412470 1 *	11 Jul 1977	7 Nov 1978	Wisconsin Alumni Research Foundation	Method for preparing a reagent for PLT and method of use
US428441 2 *	13 Jul 1979	18 Ago 1981	Ortho Diagnostics, Inc.	Method and apparatus for automated identification and enumeration of specified blood cell subclasses

* Citado pelo examinador

CITAÇÕES NÃO PROVENIENTES DE PATENTES

Referência	
1 *	Bach Immunology (1982), pp. 376-378 (Pub. John Wiley).
2	Bach--Immunology (1982), pp. 376-378 (Pub. John Wiley).
3 *	Natelson et al Clinical Immunochemistry (1978) (article by Fudenberg), pp. 228, 232, 233, 237-238, 241 and 248.
4	Natelson et al--Clinical Immunochemistry (1978) (article by Fudenberg), pp. 228, 232, 233, 237-238, 241 and 248.
5 *	Wilson et al Lymphokines, vol. 4 (1981), pp. 107-173.
6	Wilson et al--Lymphokines, vol. 4 (1981), pp. 107-173.

* Citado pelo examinador

REFERENCIADO POR

Patente Onde é Citada	Data de apresentação	Data de publicação	Requerente	Título
US4778750 *	19 Fev 1986	18 Out 1988	Imreg, Inc.	Diagnostic methods for immune function
US4886655 *	28 Nov 1986	12 Dez 1989	The University	Method of detecting

Patente Onde é Citada	Data de apresentação	Data de publicação	Requere nte	Título
			Of Otago	infection or immunity in ruminants
US5612188 *	10 Feb 1994	18 Mar 1997	Cornell Research Foundation, Inc.	Automated, multicompartm ental cell culture system
US5883224 *	19 Abr 1996	16 Mar 1999	Cytokine Sciences, Inc.	Characterizatio n of transfer factors and methods of use
US6335174	4 Abr 1997	1 Jan 2002	South Alabama Medical Science Foundatio n	Oncofetal antigen specific t-lymphocyte mediated immune response: manipulation and uses of oncofetal antigen specific CD4, CD8 cytotoxic and suppressor T cells and interleukin-10
US8647861	16 Jul 2009	11 Feb 2014	Children's Medical Center Corporati on	Organ mimic device with microchannels and methods of use and manufacturing thereof
US20030124125 *	14 Nov 2002	3 Jul 2003	South Alabama Medical Science Foundatio n	Oncofetal antigen specific T-lymphocyte mediated immune response: manipulation and uses of oncofetal antigen specific CD4, CD8 cytotoxic and

Patente Onde é Citada	Data de apresentação	Data de publicação	Requerente	Título
				suppressor T cells and interleukin-10
US20050232922 *	3 Jun 2005	20 Out 2005	Coggin Joseph H Jr	Oncofetal antigen specific T-lymphocyte mediated immune response: manipulation and uses of oncofetal antigen specific CD4, CD8 cytotoxic and suppressor T cells and interleukin-10
WO1997038089A1 *	4 Abr 1997	16 Out 1997	Univ South Alabama	Uses of oncofetal antigen specific cd4, cd8 cytotoxic and suppressor t cells and interleukin-10
WO2001056608A1 *	2 Fev 2001	9 Ago 2001	Animune Inc	Human herpesvirus 6a and 6b transfer factors for the treatment of chronic fatigue syndrome and multiple sclerosis

* Citado pelo examinador

CLASSIFICAÇÕES

Classificação EUA	dos	424/85.1 , 436/811 , 424/534 , 435/29 , 530/351 , 435/4 , 435/7.24 , 424/184.1
Classificação Internacional		G01N33/50 , G01N33/569
Classificação Cooperativa		Y10S436/811 , G01N2800/52 , G01N33/5005 , G01N33/56972

Classificação Europeia G01N33/50D, G01N33/569H2

EVENTOS LEGAIS

Data	Código	Evento	Descrição
13 Fev 1985	AS	Assignment	Owner name: MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA, 171 ASHLEY A Free format text: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST.;ASSIGNOR:WILSON, GREGORY B.;REEL/FRAME:004361/0370 Effective date: 19841206
10 Abr 1990	REMI	Maintenance fee reminder mailed	
4 Set 1990	FPAY	Fee payment	Year of fee payment: 4
4 Set 1990	SULP	Surcharge for late payment	
19 Abr 1994	REMI	Maintenance fee reminder mailed	
8 Set 1994	FPAY	Fee payment	Year of fee payment: 8
8 Set 1994	SULP	Surcharge for late payment	
6 Feb 1998	AS	Assignment	Owner name: ANIMUNE, INC., SOUTH CAROLINA Free format text: CERTIFICATE OF SALE OF SEIZED PROPERTY;ASSIGNOR:AMTRON, INC.;REEL/FRAME:008989/0889 Effective date: 19960925
31 Mar 1998	REMI	Maintenance fee reminder mailed	
17 Nov 1998	FP	Expired due to failure to pay maintenance fee	Effective date: 19980909
23 Abr	FPAY	Fee payment	Year of fee payment: 12

Data	Código	Evento	Descrição
1999			
23 Abr 1999	SULP	Surcharge for late payment	
6 Jul 1999	PRDP	Patent reinstated due to the acceptance of a late maintenance fee	Effective date: 19990528

Número de publicação	US20080081076 A1
Tipo de publicação	Candidatura
Número de candidatura	US 11/855,944
Data de publicação	3 Abr 2008
Data de apresentação	14 Set 2007
Data de prioridade	29 Set 2006
Também publicada como	CN101553247A , Mais 5 »
Inventores	David Lisonbee , Calvin McCausland , Richard Bennett , Brent Vaughan , Shane Lefler
Beneficiário Original	Lisonbee David A , Mais 4 »
Exportar citação	BiBTeX , EndNote , RefMan
Citações de Patentes (11), Citações Não Provenientes de Patentes (2), Referenciado por (16), Classificações (18), Eventos Legais (7)	
Links Externos: USPTO , Atribuição na USPTO , Espacenet	

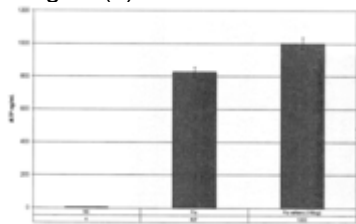
Nanofraction immune modulators, preparations and compositions including the same, and associated methods

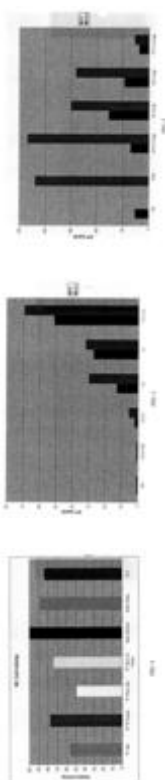
US 20080081076 A1

Resumo

Compositions that include extracts from sources of immune modulators that include nanofraction immune modulator molecules (i.e., molecules having molecular weights of about 3,000 Da and less) are disclosed. These compositions may also include other immune modulators, such as transfer factor. Administration of compositions with extracts that include nanofraction immune modulator molecules modulates the cell-mediated immunity (e.g., down-regulates undesired T cell activity) of a subject to which such compositions are administered. When administered with transfer factor, the combination of nanofraction immune modulator molecules and transfer factor down-regulates undesired T cell activity while increasing, or up-regulating, T cell activity against pathogens and other undesirable entities, such as cancer cells and other aberrant or mutated cells. Assays and assay techniques for evaluating the immune modulation capabilities of various substances are also disclosed.

Imagens(5)





Reivindicações(24)

1. A composition for improving immune function, comprising:
an immune modulating component, including:
a first part including a first extract of a source of immune modulators having an upper molecular weight cutoff of about 10,000 Da, the food product extract including transfer factor and nanofraction immune modulating molecules having molecular weights of about 3,000 Da or less; and
a second part including a second extract of a source of immune modulators having an upper molecular weight cutoff of about 3,000 Da, the extract including more of the nanofraction immune modulating molecules having molecular weights of about 3,000 Da or less.
2. The composition of claim 1, wherein the extract comprises an extract of bovine colostrum.
3. The composition of claim 1, wherein the extract further comprises an extract of chicken eggs.
4. The composition of claim 3, wherein the second extract comprises another extract of bovine colostrum.
5. The composition of claim 4, wherein the another extract of bovine colostrum comprises at least about two percent of the weight of the immune modulating component.
6. The composition of claim 5, wherein:
the extract of bovine colostrum comprises about 68% of the weight of the immune modulating component; and
the extract of chicken eggs comprises about 30% of the weight of the immune modulating component.
7. A composition for improving immune function, comprising:
an immune modulating component consisting essentially of:
a powdered extract of bovine colostrum having an upper molecular weight cutoff of about 10,000 Da;
a powdered extract of bovine colostrum having an upper molecular weight cutoff of about 3,000 Da; and
powdered egg yolk.
8. The composition of claim 7, wherein the powdered extract of bovine colostrum having an upper molecular weight cutoff of about 3,000 Da comprises at least about two percent of the weight of the immune modulating component.
9. The composition of claim 8, wherein:

the powdered extract of bovine colostrum having an upper molecular weight cutoff of about 10,000 Da comprises about 68% of the weight of the immune modulating component;
the powdered extract of bovine colostrum having an upper molecular weight cutoff of about 10,000 Da comprises about 2% of the weight of the immune modulating component; and
the powdered a whole egg yolk comprises about 30% of the weight of the immune modulating component.

10. A composition for improving immune function, comprising:

an immune modulating component consisting essentially of nanofraction molecules having molecular weights of at most about 3,000 Da.

11. The composition of claim 10, wherein the nanofraction molecules are obtained from at least one of bovine colostrum and chicken eggs.

12. A method for modulating an immune system of a subject, comprising:

administering a composition with an extract from a source of immune modulators that consists essentially of nanofraction immune modulator molecules having molecular weights of at most about 3,000 Da to the subject.

13. The method of claim 12, wherein administering consists essentially of administering a composition that consists essentially of the extract.

14. The method of claim 12, wherein administering includes administering to the subject a composition additionally including an extract of a source of immune modulators that includes immune modulator molecules having molecular weights of up to about 10,000 Da.

15. The method of claim 14, wherein administering comprises administering a composition including at least about two percent, by weight, of the extract that consists essentially of immune modulator molecules having molecular weights of up to about 3,000 Da.

16. The method of claim 15, wherein administering comprises administering a composition including:

an immune modulating component consisting of:

about 2%, by weight, of a dietary supplement comprising an extract of bovine colostrum and consisting essentially of immune modulator molecules having molecular weights of up to about 3,000 Da;

about 68%, by weight, of a dietary supplement comprising an extract of bovine colostrum and consisting essentially of immune modulator molecules having molecular weights of up to about 10,000 Da; and

about 30%, by weight, of a dietary supplement comprising chicken egg yolk.

17. The method of claim 16, wherein administering increases activity of at least one of T memory cells, T helper cells, and natural killer cells against pathogens, cancer cells, and aberrant or mutated cells.

18. The method of claim 17, wherein administering decreases undesired cell-mediated immune activity.

19. An assay method for determining the immune modulating ability of at least one molecule, comprising:

evaluating a non-stimulated activity of at least one type of immune cell;

exposing the at least one type of immune cell to a stimulator molecule;

evaluating a stimulated activity of the at least one type of immune cell;

exposing the at least one type of immune cell to a potential immune modulator; and

evaluating an effect of the potential immune modulator on the stimulated activity of the at least one type of immune cell.

20. The assay method of claim 19, wherein evaluating the activity of the at least one type of immune cell comprises evaluating the activity of at least one type of T-cell.

21. The assay method of claim 20, wherein evaluating the activity of the at least one type of T-cell comprises evaluating the activity of at least one of a CD3+ cell and a CD4+ cell.

22. The assay method of claim 19, wherein

exposing the at least one type of immune cell to a stimulator molecule comprises exposing the at least one type of immune cell to a mitogen; and

evaluating the stimulated activity comprises evaluating the increase in activity of the at least one type of immune cell following exposure to the mitogen.

23. The assay method of claim 19, further comprising:

exposing the at least one type of immune cell to a stimulator molecule comprises exposing the at least one type of immune cell to an antigen; and

evaluating the stimulated activity comprises evaluating the increase in activity of the at least one type of immune cell following exposure to the antigen.

24. The assay method of claim 19, wherein the at least one type of immune cell comprises at least one of a healthy immune cell, an immune cell from an immunologically compromised source, or an immune cell from a source that is recovering or has recently recovered from an infection.

Descrição

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

- [0001]

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/848,348, filed Sep. 29, 2006, the disclosure of which is hereby incorporated herein, in its entirety, by this reference.

FIELD OF INVENTION

- [0002]

The present invention relates to molecules that modulate (e.g., elicit, enhance, suppress undesirable activity, etc.) cell-mediated immunity in a subject, including methods for generating and obtaining such molecules, preparations and compositions that include such molecules, methods for evaluating the effectiveness of such molecules, and methods of use. More specifically, the present invention relates to small molecules, which are referred to herein as “nanofraction” molecules that modulate cell-mediated immunity.

BACKGROUND OF RELATED ART

- [0003]

The ability of antibodies to provide and transfer immunity is well known and widely researched, as are the characteristics of antibodies and the mechanisms by which antibodies are produced.

- [0004]

Not so well known or so widely researched are the roles transfer factors, which includes a family of molecules having molecular weights of between 3,500 Da and 7,500 Da, play in modulating cellular, or T-cell-mediated, immunity. Over time, the understanding that those of skill in the pertinent art have about the characteristics of transfer factors and their roles in an organism's immune system has improved and continues to improve.

- [0005]

While further research continues to shed light on the characteristics and functions of a wide variety of immune system components, there may be a large number of poorly understood, or even overlooked molecules that may have an impact on the manner in which immunity is developed, maintained, conveyed, and transferred, as well as on the effects of immunity on longevity.

SUMMARY OF THE INVENTION

- [0006]

The effectiveness of various molecules in modulating cell-mediated immunity has recently been characterized in a quantifiable manner. Molecules that may directly or

indirectly modulate cell-mediated immunity are known in the art as “immune modulators.” One class of immune modulators includes small, or low molecular weight, nanofraction (e.g., up to 3,000 Da, up to 3,500 Da, 250 Da to 2,000 Da, 2,000 Da to 4,000 Da) molecules that elicit, enhance, suppress, or otherwise modulate a cell-mediated immune response. Due to the relatively small sizes, or molecular weights, of such immune modulators, they are referred to herein as “nanofraction” immune modulators and as “nanofraction” molecules.

- [0007]

Nanofraction immune modulators may be obtained from a variety of different types of source animals. Examples of source animals include, but are not limited to, mammals (e.g., cows) and birds (e.g., chickens). Without limiting the scope of the present invention, nanofraction immune modulators may be obtained from colostrum, or even milk, produced by a mammal. As another non-limiting example, nanofraction immune modulators may be acquired from eggs produced by birds or any other type of animal. Colostrum, eggs, and other sources of nanofraction molecules are collectively referred to herein as “nanofraction sources.”

- [0008]

The natural production of nanofraction immune modulators by a source animal may be enhanced by exposing the source animal to a greater amount, or concentration, of one or more antigens than the amount(s) of such antigen(s) to which the source animal would normally be exposed. For example, if a particular type of source animal, or even a specific source animal, would, in its typical environment, normally be exposed to a certain amount or concentration of a given antigen, the source animal's production of immune modulators, including nanofraction molecules, may be enhanced by exposing the source animal to an even greater amount (e.g., concentration) of that antigen (e.g., by vaccinating the source animal, by placing the source animal into an environment where a greater amount or concentration of that antigen is present, etc.). As another example, if a particular type of source animal, or even a specific source animal, were typically vaccinated with a given antigen, the source animal's production of one or more nanofraction immune modulators could be enhanced by increasing the exposure of the source animal to an antigen (e.g., by exposing the source animal to an increased concentration of the antigen, a more effective or more virulent form of the antigen, etc.), although the nanofraction molecules are not themselves believed to be antigen specific.

- [0009]

Known processes may be used to partially, substantially, or completely purify nanofraction immune modulators from other molecules present in the nanofraction source animal from which they are obtained and, optionally, to concentrate the nanofraction immune modulators. Such processes include, without limitation, mechanical separation, phase separation (e.g., separation of aqueous and non-aqueous components from one another), precipitation, centrifugation, filtration (including microfiltration, with a molecule weight cutoff (MWCO) in the range of about 12,000 Da down to about 4,000 Da, and nanofiltration, with an MWCO of less than about 4,000 Da), dialysis, chromatographic, and electrophoretic purification processes. Such processes may be effected individually or in any combination to produce a preparation in which one or more types of immune modulators are present.

- [0010]

In one aspect, the present invention includes preparations of at least partially purified, substantially purified (e.g., to a degree accepted by those in the pertinent art), and completely purified immune modulators. Additionally, the present invention includes compositions that include nanofraction molecules. In addition to nanofraction molecules,

such compositions may include other components that are useful in supporting or modulating the immune system of a subject (e.g., transfer factor, antibodies, etc.), as well as components that may benefit the subject in other ways.

- [0011]

Methods that include use or administration of nanofraction molecules or compositions including the same, alone or with other immune modulators, are also within the scope of the present invention. Methods of use include the administration of one or more types of immune modulators (e.g., in raw, partially purified, substantially purified, or completely purified form, in a preparation, in a composition, etc.) to a subject (e.g., a human or any type of animal that is believed to benefit from the immune modulation provided by nanofraction molecules). The immune modulators are administered to a subject in an amount that increases the level (e.g., concentration) of a particular, administered type of immune modulator in the body of the subject to an above-normal amount for the subject. Without limiting the scope of this aspect of the present invention, a subject may receive an amount of one or more immune modulators that is clinically effective for causing the immune system of the subject to elicit a cell-mediated immune response or an amount that effectively enhances a cell-mediated immune response by the subject.

- [0012]

In addition, tests and testing methods that evaluate the effectiveness of immune modulators are within the scope of the present invention. As an example, a T-cell immune function assay may be used to evaluate the ability of a potential immune modulator to modulate the activity of (e.g., production of adenosine tri-phosphate (ATP) by) one or more types of cells that participate in cell-mediated immunity, either alone or in conjunction with other molecules (e.g., antigens, mitogens (which induce mitosis, or cell replication, etc.).

- [0013]

Other features and advantages will become apparent to those of skill in the art through consideration of the ensuing description and the appended claims.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- [0014]

In the drawings, FIGS. 1 through 4 are graphic illustrations of the results of various tests performed on compositions that incorporate teachings of the present invention.

DETAILED DESCRIPTION

- [0015]

It has recently been discovered that small molecules in a variety of molecular weight ranges are useful in modulating the activity of immune cells. The following EXAMPLES set forth the acts that were performed to reach these conclusions.

EXAMPLE 1

- [0016]

Using known processes, including phase separation, precipitation, filtration, microfiltration or nanofiltration, and dialysis, a variety of molecular weight fractions were

prepared from both bovine colostrum and chicken eggs. The molecular weight fractions that were obtained from bovine colostrum were: 250 Da to 2,000 Da, 2,000 Da to 4,000 Da, 4,000 Da to 8,000 Da (which includes transfer factor, and was included for the sake of comparison), and 8,000 Da to 12,000 Da. Similarly, 2,000 Da to 4,000 Da, 4,000 Da to 8,000 Da (which includes transfer factor, and was included for the sake of comparison), and 8,000 Da to 12,000 Da molecular weight fractions were prepared from chicken egg yolks. The molecular weight fractions were then dried to powder form (e.g., by spray drying, freeze drying, etc.).

- [0017]

Various assays were then conducted using these preparations to evaluate the effects of molecules in each fraction to modulate the activity of cells that convey cellular immunity (e.g., CD4+ T helper cells). Specifically, assays of the type disclosed in U.S. Pat. Nos. 5,773,232 and 6,630,316 and in U.S. Patent Application Publication 2005/0260563, the entire disclosure of each of which is hereby incorporated herein, in its entirety, by this reference, were modified and used to evaluate the activities of different molecular weight fractions from EXAMPLE 1 in a variety of conditions. The aforementioned assays are used to evaluate the production of adenosine tri-phosphate (ATP) by immune cells (e.g., CD4+ T helper cells, CD3+ cells (which includes all T-cells), etc.). The amount of ATP produced by the cells may be measured in a manner known in the art (e.g., by use of the so-called "Luciferin reaction" with a luminometer).

EXAMPLE 2

- [0018]

A first series of assays was conducted using the white blood cells of healthy individuals that include, or express, so-called "CD4" glycoproteins on their surfaces using the ImmuKnow™ assay produced by Cylex Incorporated of Columbia, Md. These white blood cells are also referred to as "CD4+" cells due to their expression of the CD4 glycoproteins. Expression of the CD4 glycoprotein distinguishes so-called "T helper" cells from other types of white blood cells, including other T cells.

- [0019]

The components of the ImmuKnow™ assay test kit were: a standard 96-well "Assay Plate," including removable eight well strips; a "Sample Diluent," which includes growth medium and a preservative; a "Stimulant," which includes phytohemagglutinin-L (PHA-L) (a substance from beans (e.g., red kidney beans) that is known to nonspecifically stimulate mitosis (a process in which a cell grows and splits into two new cells) and, thus, the preparatory production of adenosine tri-phosphate (ATP) in white blood cells (i.e., a "mitogen")), introduced into the remaining four "stimulated" wells of the eight well strip. diluted in growth medium and a preservative; "Dynabeads®*CD4," which are magnetic beads coated with mouse monoclonal anti-human CD4 antibodies and are carried by a buffered saline solution with bovine serum albumin (BSA) and preservative; a "Wash Buffer," which includes a buffered saline solution with BSA; a "Lysis Reagent," which includes a hypotonic basic solution with detergent, a "Calibrator Panel" with ATP concentrations of 0, 1, 10, 100, and 1,000 ng/ml; a "Luminescence Reagent" including luciferin and luciferase in a buffered solution, which reacts with ATP to create light in an amount indicative of the amount of ATP to which the Luminescence Reagent has been exposed; and a "Measurement Plate" with 96 wells that have opaque boundaries (i.e., walls and bases).

- [0020]

One eight well strip of the 96 well Assay Plate, which may be referred to as a “control strip,” was used to provide controls, including four “nonstimulated” (NS) control wells and four “stimulated” control wells.

- [0021]

Another eight well strip of a 96 well Assay Plate, which may be referred to as a “test strip,” was used for each sample to be tested. Four of the wells of each strip were designated as “nonstimulated” wells, while the other four wells of each strip were “stimulated” wells. Fifty microliters (50 µl) of Sample Diluent was introduced into each of the four “nonstimulated” wells of the control strip, while 25 µl of Sample Diluent was introduced into each of the “nonstimulated” wells of each test strip. Twenty-five microliters (25 µl) of Stimulant was introduced into each of the four “stimulated” wells of the control strip and into each of the four “stimulated” wells of each test strip.

- [0022]

In addition to the Sample Diluent or Stimulant, a 25 µl sample of one of the molecular weight fractions identified in EXAMPLE 1 was introduced into each of the eight wells of each test strip. More specifically, each of the molecular weight fractions of EXAMPLE 1 was reconstituted in Sample Diluent and diluted with a volume of Sample Diluent to provide three different concentrations that would ultimately, upon addition of a 25 µl sample to a well, respectively amount to the addition of 10 µg, 100 µg, and 1,000 µg of the dried powder to the well.

- [0023]

A 1:3 (blood:“Sample Diluent”) dilution of a blood sample, which had been gently agitated to uniformly distribute its constituents, including white blood cells, was prepared. Seventy-five microliters (75 µl) of diluted blood was added to each well of each strip. The contents of the wells were then mixed (e.g., by placing the plate on a shaker plate for about 30 seconds), then incubated at a temperature of 37° C. in a 5% CO₂ environment for about 18 hours.

- [0024]

Once incubation was complete, the contents of the wells were again mixed (e.g., by placing the plate on a shaker plate for about three minutes). Thereafter, the Dynabeads® solution was mixed to homogenously suspend the Dynabeads® within the liquid by which they were carried (e.g., with a vortex). As noted above, the Dynabeads® in this example include magnetic beads coated with mouse monoclonal anti-human CD4 antibodies. Fifty microliters (50 µl) of the Dynabead®-carrying solution was added to each well of each strip.

- [0025]

The contents of the wells of each strip were again mixed (e.g., on a shaker plate for about 15 seconds), then allowed to set, or incubate, at room temperature for a duration of about 15 minutes. The process of mixing and incubation was then repeated. The mouse anti-human CD4 antibodies on the Dynabeads® bind only to white blood cells exhibiting the CD4 glycoprotein. During this incubation, CD4+ white blood cells, which include T helper cells, were immobilized by, or bound to, the mouse monoclonal anti-human CD4 antibodies on the Dynabeads®.

- [0026]

Following incubation, the contents of each well were mixed again (e.g. for about 15 seconds to about 30 seconds on a shaker plate) to resuspend the Dynabeads®. The contents of each well were then introduced into a magnetic field (e.g., by placing each eight well strip in a magnet tray available from Cylex), in accordance with the protocol set forth in the instructions that accompany the ImmunoKnow™ assay. When subjected to the magnetic field, the Dynabeads® are pulled to one side of each well in which they are present. The remaining contents of the well may then be removed (e.g., aspirated with a pipette, etc.) and the beads and T helper cells washed one or more times (e.g., three times, each with 200 µl Wash Buffer) to substantially purify the same.

- [0027]

Two hundred microliters (200 µl) of Lysis Reagent was then added to each well. Following removal of the contents of each well from the magnetic field, the contents of each well (i.e., the Dynabeads®, cells attached thereto, and the Lysis Reagent) were mixed (e.g., for about five minutes on a plate shaker). The Lysis Reagent disrupted the membranes of the CD4+ cells that were immobilized by antibody on the Dynabeads®. Among other things, ATP was released from the lysed cells.

- [0028]

Once cell lysis was complete, the contents of each well were again subjected to a magnetic field, pulling the Dynabeads® within each well to one side of the well. A 50 µl sample was then transferred from each well to a corresponding well of the Measurement Plate. In addition to transferring samples, several wells of the 96 well Measurement Plate were reserved for 50 µl samples of the various ATP concentrations of the Calibrator Panel solutions.

- [0029]

One hundred fifty microliters (150 µl) of the Luminescence Reagent was then added to each well of the Measurement Plate that included either a test sample or a sample of Calibrator Panel solution. The luminescence from each well was then measured. The measured luminescence from each well provides an indication of the amount of ATP present in that well. The amount of ATP present in each well is, in turn, indicative of an amount of metabolic activity within the cells (i.e., CD4+ cells) from which the contents of each well of the Measurement Plate. In the samples that were derived from cells that were nonspecifically stimulated with PHA, a relatively high level of ATP is expected to be present. The addition of an immune modulator (e.g., from one of the fractions identified in EXAMPLE 1) would increase or decrease, or modulate, the metabolic activity in CD4+ cells that was nonspecifically stimulated by PHA.

- [0030]

The results of such testing are set forth in the following table, with the illustrated numbers, representing the mean (average) amount of ATP produced by the white blood cells of each subset:

TABLE 1

Sample		Con- trol	10 µg per well	100 µg per well	1000 µg per well
250 Da to 2,000 Da Colostrum fraction	Non-Stimulated (NS)	14	52	50	37
	Stimulated with PHA	388	336	253	127
	% reduction in PHA stimulation		13.4	34.8	67.3
2,000 Da to 4,000 Da Colostrum fraction	NS	14	52	62	42
	Stimulated with PHA	388	388	377	339
	% reduction in PHA stimulation		0	2.8	12.6
4,000 Da to 8,000 Da (includes TF) Colostrum fraction	NS	14	69	50	46
	Stimulated with PHA	388	378	250	207
	% reduction in PHA stimulation		2.6	35.6	46.6
8,000 Da to 12,000 Da Colostrum fraction	NS	14	49	45	39
	Stimulated with PHA	388	378	250	207
	% reduction in PHA stimulation		2.6	35.6	46.6
Sample		Con- trol	10 µg per well	100 µg per well	1000 µg per well
2,000 Da to 4,000 Da Egg fraction	Stimulated with PHA	388	337	237	181
	% reduction in PHA stimulation		13.1	38.9	53.4
	NS	14	49	33	44
4,000 Da to 8,000 Da (includes TF) Egg fraction	Stimulated with PHA	388	228	161	148
	% reduction in PHA stimulation		41.2	58.5	61.9
	NS	14	54	47	44
	Stimulated with PHA	388	354	230	158
	% reduction in PHA stimulation		8.8	40.7	59.3

- [0031]

These data show that in the non-simulated tests, where cells were not exposed to PHA, each of the 4,000 Da to 8,000 Da molecular weight fractions (from colostrum and egg), both of which are known to contain transfer factor, stimulated additional metabolic activity in the CD4+ white blood cells. These data confirm the ability of transfer factor to up-regulate cell-mediated immunity.

- [0032]

Conversely, the 4,000 Da to 8,000 Da colostrum and egg fractions down-regulated the nonspecific ability of PHA to stimulate metabolic activity in CD4+ cells. Since PEA is an artificial, nonspecific stimulant, the down-regulation of its activity by transfer factor, which participates in cell-mediated immunity, is not surprising. It is believed, and previous research has shown, that transfer factor helps balance, and even focus, immune activity by T-cells (e.g., by helping the cells “remember” their primary purpose, by reducing autoimmunity and associated disorders, while improving activity against undesirable entities, such as infection of a subject's body by microorganisms (bacteria, viruses, etc.), etc.). The down-regulation of PHA-stimulated activity by T-cells appears to confirm this role of transfer factor in cell-mediated immunity.

- [0033]

Similar results were seen in a number of other molecular weight fractions that do not include transfer factor, including the 250 Da to 2,000 Da colostrum fraction (both up-regulation and down-regulation), the 2,000 Da to 4,000 Da colostrum fraction (up-regulation), and the 2,000 Da to 4,000 Da egg fraction (up-regulation and down-regulation). The 8,000 Da to 10,000 Da colostrum fraction also caused up-regulation of activity in CD4+ white blood cells that were not stimulated with PHA and down-regulation of PHA stimulation of metabolic activity in CD4+ white blood cells.

- [0034]

These data establish that immune modulators other than transfer factor are present in at least the 250 Da to 2,000 Da colostrum fraction, the 2,000 Da to 4,000 Da colostrum fraction, and the 2,000 Da to 4,000 Da egg fraction. The immune modulation capabilities of the “nanofraction molecules” present in each of these fractions has been at least partially confirmed by the experiment that is set forth in EXAMPLE 3.

EXAMPLE 3

- [0035]

A second series of assays of activity induced in a healthy individual's white blood cells exhibiting the CD3 glycoprotein (i.e., CD3+ cells), which are known to include all T-cells, including so-called “T memory” cells. Specifically, Cylex's T-Cell Memory™ assay was used. The protocol of Cylex's T-Cell Memory™ assay is very similar to that set forth in EXAMPLE 2, with the following exceptions: 25 µl of the Stimulant, which included Concanavalin A (ConA) instead of PHA, was only introduced into the “stimulated” wells of the control strip, while 25 µl of a 1:10 dilution of cytomegalovirus (CMV) vaccine was added to the “stimulated” wells of each test strip (for a final, per well dilution of 1:50); mouse anti-human CD3 antibodies were immobilized to the surfaces of magnetic beads (per instructions accompanying the T-Cell Memory™ test kit) to prepare the Dynabeads®; and the Dynabeads® were added to the blood samples, Sample Diluent, Stimulant (if any), and sample fraction (if any) before the initial incubation.

- [0036]

In the T-Cell Memory™ assay, antigen is used in place of a mitogen (e.g., PHA) so that the ability of the T memory cells to recognize a particular antigen may be evaluated. Notably, the intensity of the light emitted from each well of the Measurement Plate is less, as T memory cells make up only a portion of the cells that have been bound to antibody molecules of the Dynabeads®.

- [0037]

The results of these assays are set forth in the following table, with the illustrated numbers representing the mean (average) amount of ATP produced by the white blood cells for each sample (and amount) tested:

TABLE 2

Sample		Con- trol	10 µg	100 µg	1000 µg
250 Da to 2,000 Da Colostrum fraction	Non-Stimulated (NS)	12	14	12	17
	Stimulated with CMV	316	468	338	345
	% increase in CMV stimulation		48.1	7.0	9.2
	NS	12	15	12	15
2,000 Da to 4,000 Da Colostrum fraction	Stimulated with CMV	316	501	503	440
	% increase in CMV stimulation		58.5	59.1	39.2
	NS	12	22	16	19
	Stimulated with CMV	316	473	476	475
4,000 Da to 8,000 Da (includes TF) Colostrum fraction	% increase in CMV stimulation		49.7	50.6	50.3
	NS	12	22	16	19
	Stimulated with CMV	316	473	476	475
	% increase in CMV stimulation		49.7	50.6	50.3
Sample		Con- trol	10 µg	100 µg	1000 µg
8,000 Da to 12,000 Da Colostrum fraction	NS	12	14	18	26
	Stimulated with CMV	316	453	404	370
	% increase in CMV stimulation		43.4	27.8	17.1
	NS	12	26	61	108
2,000 Da to 4,000 Da Egg fraction	Stimulated with CMV	316	305	349	350
	% increase in CMV stimulation		-3.5	10.4	10.8
	NS	12	34	39	108
	Stimulated with CMV	316	310	280	381
4,000 Da to 8,000 Da (includes TF) Egg fraction	% increase in CMV stimulation		-1.9	-11.4	20.6
	NS	12	34	39	108
	Stimulated with CMV	316	310	280	381
	% increase in CMV stimulation		-1.9	-11.4	20.6

- [0038]

The data obtained from the testing conducted in this EXAMPLE 3 demonstrate that, in the presence of an antigen (i.e., a specific stimulant, as opposed to the nonspecificity of a mitogen, such as Conk or PHA), the three non-transfer factor-containing colostrum fractions enhance the activity of the tested T memory cells to CMV to a degree that is comparable to (the 10 µg samples of the 250 Da to 2,000 Da and 8,000 Da to 12,000 Da colostrum fractions) or exceeds (the 10 µg and 100 µg samples of the 2,000 Da to 4,000 Da colostrum fraction) the ability of the comparably sized samples of the 4,000

Da to 8,000 Da, transfer factor-containing colostrum fraction to enhance the activity of the tested cells when exposed to CMV.

EXAMPLE 4

- [0039]

Another set of assays was conducted to determine whether or not either the nanofraction immune modulator molecules (i.e., the immune modulators of the 2,000 Da to 4,000 Da colostrum fraction) or the transfer-factor containing fraction (i.e., the 4,000 Da to 8,000 Da colostrum fraction) could modulate (e.g., enhance) the immune memory of a subject who had recently been exposed to a high dose of a particular antigen. Specifically, a blood sample was obtained from an individual who had been exposed to an influenza virus, which causes a systemic infection, and suffered from influenza symptoms for four weeks.

- [0040]

The assay was conducted in the manner described in EXAMPLE 3, using the Cylex T-Cell Memory™ assay in accordance with the instructions provided with that assay and set forth in EXAMPLE 3, except a influenza antigen, in the form of 1:25 dilution of a the influenza vaccine manufactured by Aventis Pasteur of Paris, France, for the 2006-2007 flu season (for a final, per well dilution of 1:125), was used in place of the CMV vaccine of EXAMPLE 3.

- [0041]

The results from that assay are set forth in the following table:

TABLE 3

Sample		Control	10 µg	100 µg	1000 µg
2,000 Da to 4,000 Da Colostrum fraction	NS	4	10	3	4
	Stimulated with influenza antigen	827	1003	906	936
	ConA	694			
	% increase in influenza antigen stimulation		21.3	9.6	13.2
4,000 Da to 8,000 Da (includes TF) Colostrum fraction	NS	4	36	24	11
	Stimulated with influenza antigen	827	989	997	830
	ConA	694			
	% increase in influenza antigen stimulation		19.6	20.6	0.4

- [0042]

The results shown in TABLE 3 (which are also shown graphically in FIG. 1) indicate that, when T memory cells of a subject who has recently been exposed to a particular antigen are exposed to that antigen, particularly in the presence of nanofraction molecules or transfer factor, activity of the CD3+ memory T-cells increases significantly. In fact, relatively small amounts of nanofraction molecules and of transfer factor caused an increase of about 20% in T memory cell activity. In fact, it appears that the immune modulators of the 2,000 Da to 4,000 Da fraction are about as effective as the transfer factor and any other molecules present in the 4,000 Da to 8,000 Da fraction in modulating the activity of the tested cells.

- [0043]

The results from EXAMPLES 1-4 indicate that immune modulators having molecular weights in the 250 Da to 2,000 Da, 2,000 Da to 4,000 Da, and 8,000 Da to 12,000 Da ranges are effective in modulating immune activity of various types of T-cells. Thus, by administering such immune modulators or preparations or compositions including the immune modulators to a subject, the subject's cell-mediated immunity may be modulated.

- [0044]

Based on these results, a process was developed for producing various dietary supplements (e.g., from (bovine) colostrum, (chicken) egg, etc.) that include molecules of a predetermined MWCO. For example, and not by way of limitation, a liquid preparation of a source of nanofraction immune modulators, from which at least macroscopic particles (e.g., colostrum/milk solids, egg shells and membranes, etc.) (e.g., by phase separation, filtration processes, etc.) have been removed may be forced through a filter with pores that are sized to provide the predetermined upper MWCO. As a nonlimiting example, a filter that provides a molecular weight cutoff of about 3,000 Da may be used. Alternatively, dialysis processes, which include use of dialysis membranes having pores that provide the desired MWCO, may be used. The use of such processes provides a "nanofraction" from which larger molecules, including transfer factor, antibodies, and a variety of other molecules having molecular weights of greater than about 3,000 Da, are excluded. (e.g., colostrum, chicken and various powdered compositions were produced. The filtrate (i.e., the portion of the liquid that has passed through the filter) may then be further processed by known techniques (e.g., freeze drying, spray drying, evaporation to form a more concentrated liquid, incorporation into a gel, etc.). The resulting "nanofraction product" may then be used alone or incorporated into other compositions.

- [0045]

It is believed that by including nanofraction molecules, even in very small amounts, in preparations that also include transfer factor (and which may also include baseline levels (i.e., those levels already present in the source (e.g., colostrum, egg, etc.) from which transfer factor is obtained), the resulting compositions will down-regulate undesired activity by T-cells (e.g., autoimmunity and associated disorders, etc.), while improving, or up-regulating, desired T-cell activity. The nanofraction-and-transfer factor compositions that are set forth in TABLES 4 and 5 were developed.

TABLE 4

TRANSFER FACTOR TRI-FACTOR	
Ingredient	Relative Amount (by weight)
Bovine Colostrum fraction, upper MWCO 10,000 Da (spray dried)	68%
Bovine Colostrum fraction, upper MWCO 3,000 Da (nanofraction) (spray dried)	2%
Chicken Egg Yolk (spray dried)	30%

- [0046]

The composition of TABLE 4 may also be referred to as an “immune modulating component.” Such an “immune modulating component” may consist essentially of a combination of sources of immune modulators (including sources of nanofraction immune modulators) or extracts of immune modulator sources, such as those listed in TABLE 4, or it may include other ingredients.

- [0047]

Likewise, a composition that incorporates teachings of the present invention may consist essentially of an “immune modulating component,” such as that disclosed in TABLE 4, or it may include other ingredients, as set forth in TABLE 5.

TABLE 5

TRANSFER FACTOR PLUS ® TRI-FACTOR	
Ingredient	Amount (per serving, serving size = one capsule)
Transfer Factor Tri-Factor	150 mg
Zinc (as monomethionine)	5 mg
Cordyvant™ Proprietary Polysaccharide Complex	440 mg
IP-6 (Inositol hexaphosphate)	
Soya bean Extract (phytosterols)	
<i>Cordyceps sinensis</i> (7% cordyceptic acids)	
Beta-Glucan (from baker's yeast) (<i>Saacharomyces cerevisiae</i>)	
Beta-Glucan (from Oat) (<i>Avena sativa</i>)	
<i>Agaricus blazeii</i> Extract	
Mannans (from <i>Aloe vera</i>) (leaf)	
Olive Leaf Extract (<i>Olea europaea</i>)	
Maitake Mushroom (<i>Grifola frondosa</i>) (whole plant)	
Shiitake Mushroom (<i>Lentinus edodes</i>) (whole plant) (5:1 extract)	

- [0048]

A composition according to the present invention may be embodied as a liquid (e.g., into the Riovida® drink available from 4Life Research, LLC, of Sandy, Utah), a powder (which may include additional ingredients to provide a desirable flavor, dissolution properties, and the like), a tablet (which additionally includes other ingredients, such as binders (e.g., starch) and the like), a gel (in which gelatin or other ingredients may be added), or in any other suitable form. It should be understood that, for purposes of this disclosure, the additional ingredients that are used to manufacture a such embodiments

of a composition of the present invention may, for purposes, of this disclosure, merely be considered to be optional and nonessential to the composition, unless otherwise required by an appended claim.

EXAMPLE 5

- [0049]

Blood was collected from an individual who had been suffering from shingles (varicella zoster virus (VZV) infection) symptoms for about four weeks. The blood was then assayed using the Immuknow™ assay in the manner described in EXAMPLE 2, with the sample fractions of EXAMPLE 2 having been replaced with the following: (a) a control that included no immune modulators; (b) a colostrum fraction having a MWCO of about 3,000 Da that had been spray dried; (c) 4Life Transfer Factor® XF, which is currently available from 4Life Research and includes a bovine colostrum extract with an upper MWCO of about 10,000 Da, was added; (d) the composition in TABLE 4, which is labeled as "TF Tri-Factor"; and (e) the composition of TABLE 5, which is labeled as "TFPlus Tri-Factor." Each of (b) through (e) was reconstituted in the Sample Diluent that accompanied the Immuknow™ assay, and diluted to a concentration that resulted in a final, per-well concentration of 1 mg/ml once blood samples and all other liquids had been added to each well.

- [0050]

The results from those assays are set forth in the following table:

TABLE 6					
	Control	Nano- fraction	TF XF	TF Tri- Factor	TFPlus Tri-Factor
Non-Stimulated (NS)	26	35	77	47	19
Stimulated with PHA	220	234	150	140	27

- [0051]

These results also appear in the graph of FIG. 2.

- [0052]

It is reiterated that these results were obtained at a point in time (about four weeks following initial infection; i.e., during convalescence) where, in the absence of stimulation, T helper (CD4+) cell activity is expected to decrease, although a large number of T helper cells remain in the subject's blood. T helper cell activity was stimulated only slightly, in the absence of the nonspecific stimulant PHA, by the nanofraction, TF XF and TF Tri-Factor compositions, and does not appear to have been stimulated by TFPlus Tri-Factor. The nonspecific stimulation of T helper cells by PHA was, however, reduced significantly by the TF XF and TF Tri-Factor compositions, and to an even larger extent by the TFPlus Tri-Factor composition, as might be expected from the results of EXAMPLE 2, as set forth in TABLE 1.

EXAMPLE 6

- [0053]

At an earlier point in time (about one week following the onset of shingles symptoms), it would be expected that T memory cells, although not present in the subject's blood in large concentrations due to the localized nature of the VZV infections that cause shingles (i.e., relatively low blood titers of VZV), would have already recognize the VZV infection and be readily stimulated by the presence of VZV antigen. Accordingly, a T-Cell Memory™ assay was conducted to determine the effects of the nanofraction, TF XF, TF Tri-Factor, and TFPlus Tri-Factor on T memory cells from blood from the same patient as that tested in EXAMPLE 5. The protocol set forth in EXAMPLE 3 was followed, with the following exceptions: VZV vaccine, which had been diluted 1:10, was used in place of CMV vaccine (for a final, per well dilution of 1:50); and the sample fractions of EXAMPLE 3 were replaced with the control and immune modulators used in EXAMPLE 5, with each immune modulator having been diluted to a final, per-well concentration of 100 µg/ml.

- [0054]

The following table sets forth the results of the assay:

TABLE 7					
	Control	Nano-fraction	TF XF	TF Tri-Factor	TFPlus Tri-Factor
Non-Stimulated (NS)	1	2	13	27	51
Stimulated with VZV	1	5	30	32	69
Stimulated with ConA	288				

- [0055]

This data is also depicted graphically in FIG. 3.

- [0056]

As expected, transfer factor, which is present in TF XF, stimulated activity by the T memory cells. The addition of a small amount of extra nanofraction molecules to the transfer factor significantly increased the activity of T memory cells, both with and without additional VZV stimulation. Thus, the results of EXAMPLES 5 and 6 confirm that the addition of extra nanofraction molecules to preparations that also include transfer factor, even in very small amounts, will down-regulate undesired activity by T-cells (e.g., autoimmunity and associated disorders, etc.), while improving, or up-regulating, desired T-cell activity.

EXAMPLE 7

- [0057]

In another study, which was conducted to determine the abilities of various compositions, including the compositions including transfer factor and extra nanofraction molecules set forth in TABLES 4 and 5, to stimulate natural killer (NK) cell activity against the human erythroblast leukemia cell line K-562, which is sensitive to NK cells, were evaluated. Accordingly, the NK cells are also referred to herein as "effector cells," while the K-562 cells are also referred to herein as "tumor cells" and as "target cells." Specifically, MTT Assay technology was used, in which 3-(4,5-

Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), which is yellow, is reduced to formazan, which is purple, by reductase enzymes in the active mitochondria of living cells. Just prior to analysis of cytotoxicity, a solution (e.g., dimethyl sulfoxide, sodium dodecyl sulfate (SDS) in dilute hydrochloric acid (HCl), etc.) that will dissolve formazan is added to each well. Spectrophotometry, in which the amount of light of a certain wavelength (e.g., a wavelength in the range of about 500 nm to about 600 nm) absorbed by the solution in each well is measured, is then used to determine the numbers of living cells in the assayed wells, relative to the number of living cells in one or more control wells into which no test compositions were added.

- [0058]

The compositions that were evaluated included Transfer Factor Advanced™, available from 4Life Research, LLC; Transfer Factor Plus Advanced™, also available from 4Life; Transfer Factor Tri-Factor, which includes both transfer factor and an elevated amount of nanofraction molecules; Transfer Factor Plus Tri-Factor, which includes transfer factor, an elevated amount of nanofraction molecules, and other ingredients that are believed to enhance immune system activity; nanofraction molecules from bovine colostrum; nanofraction molecules from chicken eggs; and interleukin-2 (IL-2), available under the trade name Proleukin from Chiron of the Netherlands, which is known to enlist NK cells against cancer cells.

- [0059]

Blood was obtained from five healthy donors. Known processes were used to isolate white blood cells from other constituents of the blood. Known density gradient centrifugation techniques (e.g., using a Histopaque® density gradient available from Sigma-Aldrich Corporation of St. Louis, Mo.) were used to isolate mononuclear cells, including NK cells, from other types of white blood cells. The mononuclear cells were introduced into RPMI 1640 growth medium with 10% fetal calf serum (FCS). Equal volumes of this mixture, including a concentration of about 60,000 white blood cells in 100 µl of culture medium, were introduced into different wells of a standard 96-well plate. Reconstituted samples of the transfer factor and/or nanofraction molecule-containing compositions identified above, each having a concentration of 0.100 mg powder to 1 ml sterile, deionized water, were each added to three different wells containing the white blood cells and growth medium, for a total of eighteen wells. In addition, 1,000 IU/ml IL-2 were introduced into three positive control wells containing the mononuclear cell-growth medium mixture. Three negative control wells included only the mononuclear cell-growth medium mixture, with no immune modulators. Three effector cell-only negative control wells also included only the mononuclear cell-growth medium mixture, while three target cell-only negative control wells included only 100 µl of growth medium.

- [0060]

The mononuclear cells were incubated with their respective immune modulation compositions (except for the three negative control wells) in the presence of 5% CO₂ at a temperature of 37° C. and 100% humidity for 48 hours.

- [0061]

Following incubation, about 30,000 K-562 cells were introduced into each well, except for the three effector cell-only negative control wells, that contained mononuclear cells and growth medium. The 96-well plate and the mixtures in its wells were again incubated in the presence of 5% CO₂ at a temperature of 37° C. and 100% humidity for 48 hours.

- [0062]

The MTT solution, having a concentration of 5 mg MTT/ml Henk's saline solution, was prepared in accordance with known, standard techniques. Twenty microliters (20 µl) of the MTT solution was introduced into each mononuclear cell-growth medium-tumor cell-containing well of the 96-well plate. The plate and the contents of its wells were again incubated in the presence of 5% CO₂ at a temperature of 37° C. and 100% humidity, this time for about four hours.

- [0063]

Following this final incubation, the 96-well plate was centrifuged at about 1,500 rpm for about five minutes. Thereafter, the supernatant (liquid) was removed from each well, and 150 µl of dimethylsulfoxide (DMSO) was introduced into to each mononuclear cell and tumor cell-containing well. A spectrophotometer was then used to measure the optical density, at a wavelength of 540 nm, of each cell-containing well. The measured optical density was then used to determine the cytotoxic index (%) (CI (%)) of the NK cells, as activated by each tested substance, using the following formula: $CI (\%) = [1 - (OD_{e+t} - OD_e) / OD_t] \times 100$,

- [0064]

where OD_{e+t} is optical density of each test well corresponding to a tested composition, including the IL-2 of the positive control, OD_e is the average optical density of the three effector cell-only negative control wells, and OD_t is the average optical density of the three target cell-only negative control wells. The CI(%) represents the percentage of target cells that have been killed by NK cells in each well that also contained a tested immune modulation composition. The results are presented in the following table:

TABLE 8

Immune Modulation Composition	CI (%)	Relative Activity
Transfer Factor Advanced	43.1	55
Transfer Factor Plus Advanced	38.5	49
Transfer Factor Tri-Factor	60.3	77
Transfer Factor Plus ® Tri-Factor	57.9	74
Nanofraction molecules, colostrum	77.9	100
Nanofraction molecules, egg	68.7	88
IL-2	77.0	84

- [0065]

These data, which are also depicted in the chart of FIG. 4, show that compositions including nanofraction molecules, particularly those from bovine colostrum, are about as effective as or more effective than IL-2 at eliciting NK cell activity against K-562 tumor cells, while compositions that include transfer factor from colostrum and eggs and nanofraction molecules from colostrum (i.e., the Transfer Factor Tri-Factor and the Transfer Factor Plus® Tri-Factor) activate NK cells more effectively than compositions that lack nanofraction molecules.

- [0066]

By adding as little as 2% more nanofraction molecules, by weight, to a composition that includes transfer factor, the nano fraction molecules may boost action by nonspecific components (e.g., NK cells) of the cell-mediated portion of a subject's immune system, complementing the ability of transfer factor to elicit activity by antigen-specific components of the cell-mediated portion of the subject's immune system.

- [0067]

When considered together, the results of EXAMPLES 5 through 7 demonstrate that transfer factors regulate and prime T helper cells, which enable a subject's immune system to respond more quickly and efficiently to pathogens and other undesired entities. In addition, EXAMPLES 5 through 7 illustrate that transfer factor may enhance the activity of T memory cells.

- [0068]

EXAMPLES 5 through 7 also show that the addition of extra nanofraction immune modulator molecules to compositions that include transfer factor may fortify and enhance the immune modulation (e.g., of T helper cells, T memory cells, and NK cells) of transfer factor and of existing compositions that include transfer factor.

- [0069]

A method of modulating the cell-mediated immunity of a subject includes administering (e.g., enterally, parenterally, etc.) a composition including nanofraction molecules to the subject. The nanofraction molecules may be administered alone, or as part of a composition that consists essentially of nanofraction molecules, or they may be administered with a composition (e.g., a composition such as that set forth in TABLE 4 or TABLE 5) that includes transfer factor. Administration may occur on a regular basis in an effort to maintain an overall balance in the subject's cell-mediated immunity, or it may be effected in response to an infection, an autoimmune disorder, tissue transplant, or another event that affects (activates or suppresses) the cell-mediated immunity of the subject.

- [0070]

Administration of compositions that include nanofraction immune modulator molecules in accordance with teachings of the present invention is believed to modulate cell-mediated immune activity based on physiological need. For example, undesired cell-mediated immune activity (e.g., autoimmunity, etc.) may be reduced. As another example, the ability of T cells to remove undesirable pathogens, as well as other undesirable entities, such as cancer cells and other aberrant or mutated cells, from the body of a subject (e.g., by activating T helper (CD4+) cells, which in turn activate natural killer (NK) cells, by increasing antigen-specific immunity by enabling T memory cells, etc.) may also be focused and enhanced, particularly when transfer factor is administered with an additional amount of nanofraction immune modulator molecules.

- [0071]

Although the foregoing description contains many specifics, these should not be construed as limiting the scope of the present invention, but merely as providing illustrations of some of the presently preferred embodiments. Similarly, other embodiments of the invention may be devised which do not depart from the spirit or scope of the present invention. Features from different embodiments may be employed in combination. The scope of the invention is, therefore, indicated and limited only by the appended claims and their legal equivalents, rather than by the foregoing description. All additions, deletions and modifications to the invention as disclosed herein which fall within the meaning and scope of the claims are to be embraced thereby.

Citações de Patentes

Patente Citada	Data de apresentação	Data de publicação	de	Requerente	Título
US4402938 *	22 Jun 1981	6 Set 1983		Impro Products, Inc.	Food and the method of extracting the same from colostrum and milk
US4816563 *	15 Nov 1984	28 Mar 1989		Amtron, Inc.	Process for obtaining transfer factor from colostrum, transfer factor so obtained and use thereof
US5585098 *	6 Jan 1995	17 Dez 1996		Ovimmune, Inc.	Oral administration of chicken yolk immunoglobulins to lower somatic cell count in the milk of lactating ruminants
US5773232 *	12 Set 1997	30 Jun 1998		Biotechnology Transfer, Inc.	Methods for measurement of lymphocyte function
US6630316 *	14 Abr 1998	7 Out 2003		Cylex, Inc.	Method for measurement of lymphocyte function
US6866868 *	15 Set 2003	15 Mar 2005		4Life Research, Lc	Compositions including different types of transfer factor, methods for making the compositions, and methods of treatment using the compositions
US7094415 *	1 Out 2002	22 Ago 2006		L'avenir, Llc	Skin care products containing whole egg
US7169571 *	15 Set 2003	30 Jan 2007		Cylex, Inc.	Methods for measurement of lymphocyte function
US20020044942 *	18 Set 2001	18 Abr 2002		Chisolm Biological Laboratory, Llc	Transfer factor composition and process for producing same
US20030152641 *	11 Fev 2003	14 Ago 2003		Subramanian Iyer	Purified cytokine inhibitory factor
US20040005327 *	15 Mai 2003	8 Jan 2004		Subramanian Iyer	Immune T-cell stimulation

* Citado pelo examinador

Citações Não Provenientes de Patentes

Referência

1 * Bacsi A et al. 2005. Colostrinin-Driven Neurite Outgrowth Requires p53 Activation in PC12 Cells. Cell Mol Neurobiol 25: 1123-1139.

2 * Kruzel ML et al. 2001. Towards an Understanding of Biological Role of Colostrinin Peptides. J Mol Neurosci 17: 379-389.

* Citado pelo examinador

Referenciado por

Patente Citada	Onde é	Data de apresentação	Data de publicação	de	Requerente	Título
US9028882		5 Mai 2009	12 Mai 2015		4Life Patents, Llc	Nutraceutical gels
US9328152 *		17 Dez 2012	3 Mai 2016		Instituto Politecnico Nacional	Method for obtaining a dialyzable leukocyte extract
US20070071836 *		2 Mai 2006	29 Mar 2007		Mccausland Calvin W	Transfer factor preparations and associated methods

Patente Citada	Onde é Data apresentação	de Data publicação	de	Requerente	Título
US20100119531 *	5 Mai 2009	13 2010	Mai	4Life Patents, Llc	Nutriceutical gels
US20100297663 *	5 Mai 2010	25 2010	Nov	4Life Patents, Llc	Methods and systems for assaying, maintaining, and enhancing the activity of the immune system of a subject
US20140357840 *	17 Dez 2012	4 Dez 2014		Instituto Politecnico Nacional	Method for obtaining a dialyzable leukocyte extract
WO2013039373A2 *	13 Set 2012	21 2013	Mar	Zepeda Lopez Hector Manuel	Dialysed extract of leucocytes from shark spleen, for obtaining a transfer factor with increased potential, and method for extracting, checking and counting same
WO2013039373A3 *	13 Set 2012	4 Jul 2013		Zepeda Lopez Hector Manuel	Dialysed extract of leucocytes from shark spleen, for obtaining a transfer factor with increased potential, and method for extracting, checking and counting same
WO2013039374A2 *	13 Set 2012	21 2013	Mar	Zepeda Lopez Hector Manuel	Method for extracting, testing and counting dialysed leukocyte extract from shark spleen in order to obtain an enhanced transfer factor, specifically designed to be used as a treatment against the disease known as vitiligo
WO2013039374A3 *	13 Set 2012	2 Mai 2013		Zepeda Lopez Hector Manuel	Method for extracting, testing and counting dialysed leukocyte extract from shark spleen in order to obtain an enhanced transfer factor, specifically designed to be used as a treatment against the disease known as vitiligo
WO2013043032A2 *	19 Set 2012	28 2013	Mar	Zepeda Lopez Hector Manuel	Dialysed extract of leucocytes from shark spleen, for obtaining a transfer factor with increased potential, specifically designed to be used as an immunomodulator, and method for extracting, checking and counting same
WO2013043032A3 *	19 Set 2012	13 2013	Jun	Zepeda Lopez Hector Manuel	Dialysed extract of leucocytes from shark spleen, for obtaining a transfer factor with increased potential, specifically designed to be used as an immunomodulator, and method for extracting, checking and counting same
WO2013043033A2 *	19 Set 2012	28 2013	Mar	Zepeda Lopez Hector	Method for extracting and checking a dialysed extract of

Patente Citada	Onde é Data de apresentação	Data de publicação	Requerente	Título
			Manuel	leukocytes from shark spleen, in order to obtain a transfer factor with increased potential, specifically designed to be used as an adjuvant for increasing the potential of viral vaccines
WO2013043033A3 *	19 Set 2012	11 Jul 2013	Zepeda Lopez Hector Manuel	Method for extracting and checking a dialysed extract of leukocytes from shark spleen, in order to obtain a transfer factor with increased potential, specifically designed to be used as an adjuvant for increasing the potential of viral vaccines
WO2013058640A2 *	20 Set 2012	25 Abr 2013	Zepeda Lopez Hector Manuel	Method for the extraction, verification and counting of dialyzed leukocyte extract originating from shark spleen in order to obtain potentialized transfer factor, specifically designed for use as treatment against the disease known as asthma
WO2013058640A3 *	20 Set 2012	20 Jun 2013	Zepeda Lopez Hector Manuel	Method for the extraction, verification and counting of dialyzed leukocyte extract originating from shark spleen in order to obtain potentialized transfer factor, specifically designed for use as treatment against the disease known as asthma

* Citado pelo examinador
Classificações

Classificação dos EUA [424/535](#), [435/29](#), [424/581](#)

Classificação Internacional [A61K35/54](#), [A61P37/04](#), [A61K35/20](#), [C12Q1/02](#)

Classificação Cooperativa [A61K35/57](#), [A23L1/305](#), [G01N33/505](#), [G01N2333/70514](#), [A61K35/20](#), [A23L1/30](#)

Classificação Europeia G01N33/50D2F2B, A61K35/54, A61K35/20, A23L1/30, A23L1/305

Eventos Legais

Data	Código	Evento	Descrição
20 Dez 2007	AS	Assignment	Owner name: 4LIFE PATENTS, LLC, UTAH Free format text: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST;ASSIGNORS:LISONBEE, DAVID;MCCAUSLAND, CALVIN W.;BENNETT, RICHARD H.;AND OTHERS;REEL/FRAME:020280/0408;SIGNING DATES FROM 20071128 TO 20071213
11 Nov 2008	AS	Assignment	Owner name: CHASE CAPITAL CORPORATION, ILLINOIS Free format text: SECURITY AGREEMENT;ASSIGNOR:4LIFE RESEARCH, LLC;REEL/FRAME:021805/0867 Effective date: 20081031
13 Nov	AS	Assignment	Owner name: CHASE CAPITAL CORPORATION, ILLINOIS Free format text: CORRECTIVE ASSIGNMENT TO CORRECT THE

Data	Código	Evento	Descrição
2008			<p>ASSIGNOR TO ALSO INCLUDE 4LIFE PATENTS, LLC PREVIOUSLY RECORDED ON REEL 021805 FRAME 867.;ASSIGNORS:4LIFE RESEARCH, LLC;4LIFE PATENTS, LLC;REEL/FRAME:021824/0333</p> <p>Effective date: 20081031</p> <p>Owner name: CHASE CAPITAL CORPORATION, ILLINOIS</p> <p>Free format text: CORRECTIVE ASSIGNMENT TO CORRECT THE ASSIGNOR TO ALSO INCLUDE 4LIFE PATENTS, LLC PREVIOUSLY RECORDED ON REEL 021805 FRAME 867. ASSIGNOR(S) HEREBY CONFIRMS THE GRANT OF SECURITY INTEREST FROM 4LIFE RESEARCH, LLC AND 4LIFE PATENTS, LLC TO CHASE CAPITAL CORPORATION, AS ADMINISTRATIVE AGENT;ASSIGNORS:4LIFE RESEARCH, LLC;4LIFE PATENTS, LLC;REEL/FRAME:021824/0333</p> <p>Effective date: 20081031</p> <p>Owner name: 4LIFE PATENTS, LLC, UTAH</p> <p>Free format text: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST;ASSIGNORS:LISONBEE, DAVID;MCCAUSLAND, CALVIN W.;BENNETT, RICHARD H.;AND OTHERS;REEL/FRAME:022743/0010</p>
27 Mai 2009	AS	Assignment	<p>Effective date: 20070914</p> <p>Owner name: 4LIFE PATENTS, LLC, UTAH</p> <p>Free format text: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST;ASSIGNOR:TEW, STEVEN D.;REEL/FRAME:022741/0991</p> <p>Effective date: 20070918</p> <p>Owner name: 4LIFE RESEARCH, LC, UTAH</p> <p>Free format text: CORRECTIVE ASSIGNMENT TO CORRECT THE ASSIGNOR TO 4LIFE PATENTS, LLC AND TO CORRECT THE ASSIGNEE TO 4LIFE RESEARCH, LC PREVIOUSLY RECORDED ON REEL 022741 FRAME 0992. ASSIGNOR(S) HEREBY CONFIRMS THE ASSIGNMENT TO 4LIFE RESEARCH, LC;ASSIGNOR:4LIFE PATENTS, LLC;REEL/FRAME:030745/0521</p> <p>Effective date: 20070918</p>
2 Jul 2013	AS	Assignment	<p>Owner name: 4LIFE RESEARCH, LLC, UTAH</p> <p>Free format text: CHANGE OF NAME;ASSIGNOR:4LIFE RESEARCH, LC;REEL/FRAME:030776/0849</p> <p>Effective date: 20080703</p>
11 Jul 2013	AS	Assignment	<p>Owner name: 4LIFE RESEARCH, LLC, UTAH</p> <p>Free format text: CHANGE OF NAME;ASSIGNOR:4LIFE RESEARCH, LC;REEL/FRAME:030776/0849</p> <p>Effective date: 20080703</p>
9 Set 2014	AS	Assignment	<p>Owner name: 4LIFE PATENTS, LLC, UTAH</p> <p>Free format text: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST;ASSIGNOR:4LIFE RESEARCH, LLC;REEL/FRAME:033699/0322</p> <p>Effective date: 20080901</p>